

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie

Einfluss von Niacin auf die Ausdauerleistungsfähigkeit von Mäusen

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)



eingereicht am Fachbereich Biologie und Chemie der
Justus-Liebig Universität Giessen

Vorgelegt von
M.Sc. troph., M.Sc. agr. Anna Marie Kynast

Eschenlohe
2017

Diese Doktorarbeit wurde angefertigt im Interdisziplinären Forschungszentrum der Justus-Liebig Universität, am Fachbereich 09 Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement am dazugehörigen Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie unter der Supervision von Herrn Prof. Dr. Klaus Eder.

1. Gutachter und Vorsitzender im Promotionsausschuss:

Prof. Dr. Klaus Eder, Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Interdisziplinäres Forschungszentrum, Justus-Liebig Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen

2. Gutachter und Vorsitzender im Promotionsausschuss:

Prof. Dr. Holger Zorn, Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig Universität Giessen, Heinrich-Buff-Ring 17-19, 35392 Giessen

weitere Mitglieder des Promotionsausschusses:

Prof. Dr. Karsten Krüger

Dr. Uwe Wenzel

Datum der Disputation: 14. September 2017

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | IV |
| TABELLENVERZEICHNIS | V |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Niacin – Struktur und Wirkung | 1 |
| 1.2 Wirkung des Niacins in pharmakologischen Konzentrationen | 3 |
| 1.3 Skelettmuskulatur – Aufbau und Funktion | 9 |
| 1.4 Energieversorgung der Skelettmuskulatur..... | 11 |
| 1.5 Veränderung des metabolischen Muskelphänotyps durch Ausdauer- training und Niacinsupplementierung | 12 |
| 1.6 Effekte von Niacin auf die Leber | 15 |
| 2 Zielsetzung | 17 |
| 3 Material und Methoden..... | 20 |
| 3.1 Versuchsaufbau | 20 |
| 3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen | 20 |
| 3.1.2 Futterzusammensetzungen und Fütterung | 21 |
| 3.2 Ergospirometrie und Ausdauertraining | 24 |
| 3.3 Gewinnung des Probenmaterials | 26 |
| 3.4 Material..... | 27 |
| 3.4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien..... | 27 |
| 3.4.2 Verwendete Puffer und Lösungen und Reaktionsysteme (<i>Kits</i>) | 33 |
| 3.4.3 Verwendete Antikörper und Primer | 36 |
| 3.5 Methoden | 41 |
| 3.5.1 Bestimmung von Niacinparametern im Plasma..... | 41 |
| 3.5.2 Bestimmung von Lipidparametern im Plasma..... | 44 |
| 3.5.3 Bestimmung von Carnitinparametern im Plasma und in der Leber | 45 |
| 3.5.4 Bestimmung des Glycogengehalts in der Muskulatur und der Leber..... | 48 |
| 3.5.5 Bestimmung der Muskelfaserverteilung | 50 |
| 3.5.6 Genexpressionsanalysen in der Leber und in der Muskulatur..... | 51 |
| 3.5.7 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration | 54 |
| 3.5.8 SDS-PAGE und Western Blot..... | 55 |
| 3.5.9 Statistische Auswertung | 59 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 4 | Ergebnisse | 60 |
| 4.1 | Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme..... | 60 |
| 4.2 | Entwicklung der Ausdauerleistungsfähigkeit | 61 |
| 4.3 | Biochemische Parameter im Plasma | 63 |
| 4.3.1 | Niacinstatus..... | 63 |
| 4.3.2 | Carnitinstatus | 63 |
| 4.3.3 | Freie Fettsäuren und Triacylglyceride..... | 63 |
| 4.4 | Biochemische Parameter in der Leber und der Muskulatur | 65 |
| 4.4.1 | Carnitin..... | 65 |
| 4.4.2 | Leberglycogen und Muskelglycogen..... | 66 |
| 4.5 | Muskelfaserzusammensetzung | 67 |
| 4.5.1 | Verteilung der Muskelfasertypen im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 67 |
| 4.5.2 | Expression von <i>Myosin Heavy Chain</i> -Isoformen im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 71 |
| 4.6 | Expression von Genen des kontraktilen und metabolischen Muskelfaserphänotyps im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 72 |
| 4.6.1 | mRNA-Konzentrationen von Genen der molekularen Regulatoren der Muskelfasertransformation im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 72 |
| 4.6.2 | mRNA-Konzentrationen von Genen der Angiogenese, der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 74 |
| 4.6.3 | mRNA-Konzentrationen von Genen der Angiogenese, der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 76 |
| 4.6.4 | mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 78 |
| 4.6.5 | Relative Proteinkonzentrationen von PGC-1 α und GAPDH im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> | 80 |
| 4.7 | Expression von Genen des Fettsäuretransports, des Fettsäuremetabolismus und des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber..... | 83 |
| 4.7.1 | mRNA-Konzentrationen von Genen des Fettsäuretransports und des Fettsäuremetabolismus in der Leber | 83 |
| 4.7.2 | mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber..... | 85 |
| 5 | Diskussion..... | 86 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 114 |

| | | |
|---|-------------------------------|-----|
| 7 | Literatur..... | 117 |
| 8 | Danksagung..... | 139 |
| 9 | Ehrenwörtliche Erklärung..... | 140 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Strukturformeln von Nikotinsäure (NA), Nikotinsäureamid (NAM), Nikotinsäureamid-Ribosid (NR) und Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) (<i>modifiziert nach Present knowlege of nutrition, 10th edition, 2012</i>)..... | 1 |
| Abbildung 1.2: Synthese-Wege für NAD: Preiss-Handler-Weg und NAD-Salvage pathway (<i>modifiziert nach Present knowlege of nutrition, 10th edition, 2012</i>)..... | 2 |
| Abbildung 1.3: Biotransformation von Niacin (<i>modifiziert nach Chapman et al., 2010</i>)..... | 8 |
| Abbildung 1.4: Einfluss von Ausdauertraining und Niacin auf die Muskelzelle..... | 15 |
| Abbildung 3.1: Maus in der Kammer des Laufbandes für die Ergospirometrie in der Äquilibrierungsphase | 24 |
| Abbildung 3.2: Zeitstrahl der Testung des Ausdauerleistungsvermögens (ALV) und Durchführung des Ausdauertrainings (AT)..... | 26 |
| Abbildung 4.1: Repräsentative Bilder von Querschnitten des <i>M. gastrocnemius</i> der Mäuse zur Differenzierung der Muskelfasertypen anhand der MHC-Isoformen nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 69 |
| Abbildung 4.2: Repräsentative Bilder von Querschnitten des <i>M. rectus femoris</i> der Mäuse zur Differenzierung der Muskelfasertypen anhand der MHC-Isoformen nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 70 |
| Abbildung 4.3: Repräsentative Immunoblots für GAPDH (A) und PGC-1 α (B) und Vinculin als interne Kontrolle im <i>M. gastrocnemius</i> jeweils eines Tieres der Versuchsgruppen nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 81 |
| Abbildung 4.4: Repräsentative Immunoblots für GAPDH (A) und PGC-1 α (B) und Vinculin als interne Kontrolle im <i>M. rectus femoris</i> jeweils eines Tieres der Versuchsgruppen nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 82 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 3.1: Einteilung der Versuchstiere in verschiedene Behandlungsgruppen..... | 20 |
| Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Diäten nach Empfehlung des <i>American Institute of Nutrition</i> | 21 |
| Tabelle 3.3: Mineralstoffmix AIN-93G-MX – Gehalt an Mineralien pro kg Diät (AIN-93G)..... | 22 |
| Tabelle 3.4: Vitaminmix AIN-23G-VX - Gehalt an Vitaminen pro kg Diät (AIN-93G)..... | 23 |
| Tabelle 3.5: Ablauf der Ergospirometrie zur Bestimmung der Ausdauerleistungsfähigkeit bei Mäusen | 25 |
| Tabelle 3.6: Verwendete Geräte mit Angaben des Herstellers | 27 |
| Tabelle 3.7: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Angaben des Herstellers..... | 29 |
| Tabelle 3.8: Verwendete Chemikalien mit Angaben des Herstellers..... | 30 |
| Tabelle 3.9: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen | 33 |
| Tabelle 3.10: Verwendete Reaktionssysteme (<i>Kits</i>) mit Angaben des Herstellers | 35 |
| Tabelle 3.11: Primäre und sekundäre Antikörper zur Bestimmung der Muskelfaserverteilung | 36 |
| Tabelle 3.12: Verwendete Primer und deren Eigenschaften für RTD-PCR..... | 37 |
| Tabelle 3.13: Verwendete primäre Antikörper für den <i>Western Blot</i> | 40 |
| Tabelle 3.14: Verwendete sekundäre Antikörper für den <i>Western Blot</i> | 40 |
| Tabelle 3.15: Technische Daten zur Analyse der Konzentrationen von Niacin und Niacinmetaboliten mittels HPLC-MS/MS | 41 |
| Tabelle 3.16: <i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM) Übergänge und optimierte Verbindungsparameter für die Messung von Nikotinsäure (NA) und deren Metaboliten.. | 43 |
| Tabelle 3.17: Technische Daten zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ - Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS..... | 45 |
| Tabelle 3.18: Kalibrationsbereiche zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ -Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS..... | 46 |
| Tabelle 3.19: Analysierte Massen der Mutter-/Tochterionen und Stoffparameter für die MS/MS-Detektion von Carnitin, Acetylcarnitin und deren deuterierten Metaboliten | 47 |
| Tabelle 3.20: Pipettierschema zur Bestimmung der Glyogenkonzentration in Halbmikroküvetten | 49 |
| Tabelle 3.21: Verdünnung und MHC Reaktivität der primären und sekundären Antikörpercocktails zur Bestimmung der Muskelfaserverteilung bei der Maus | 50 |
| Tabelle 3.22: Zusammensetzung des Mastermixes für einen Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese | 52 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 4.1: Entwicklung der Futteraufnahmen und des Gewichtes bei Mäusen während der 6-wöchigen Versuchsperiode..... | 60 |
| Tabelle 4.2: Parameter der Ergospirometrie (Distanz, VO ₂ max, Geschwindigkeit und Dauer) bei Mäusen während der 6-wöchigen Versuchsperiode | 62 |
| Tabelle 4.3: Nikotinamid-Konzentration im Plasma der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 64 |
| Tabelle 4.4: Konzentrationen an Carnitinparametern (Gesamtcarnitin, L-Carntin, Acetyl-Carnitin und die Carnitinvorstufen γ -Betyrobetain und Trimethyllysin) im Plasma der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode | 64 |
| Tabelle 4.5: Konzentrationen an freien Fettsäuren und Triacylglyceriden im Plasma der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode | 64 |
| Tabelle 4.6: Konzentration an Carnitinparametern (Gesamtcarnitin, L-Carntin, Acetyl-Carnitin und die Carnitinvorstufen γ -Betyrobetain und Trimethyllysin) in der Leber der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode | 65 |
| Tabelle 4.7: Glycogenkonzentration in der Leber und der Muskulatur der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 66 |
| Tabelle 4.8: Prozentuale Zusammensetzung der Muskelfasern im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 68 |
| Tabelle 4.9: Relative mRNA-Konzentrationen der MHC-Isoformen im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 73 |
| Tabelle 4.10: Relative mRNA-Konzentrationen von Regulatoren der Muskelfasertransformation im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode | 73 |
| Tabelle 4.11: Relative mRNA-Konzentrationen von Genen der Angiogenese, der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> nach 6-wöchiger Versuchsperiode | 75 |
| Tabelle 4.12: Relative mRNA-Konzentrationen von Genen des Fettsäuretransports und des Fettsäuremetabolismus im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode | 77 |
| Tabelle 4.13: Relative mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels im <i>M. gastrocnemius</i> und im <i>M. rectus femoris</i> der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 79 |
| Tabelle 4.14: Relative Proteinkonzentrationen von GAPDH und PGC-1 α im <i>M. gastrocnemius</i> von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... | 81 |
| Tabelle 4.15: Relative Proteinkonzentrationen von GAPDH und PGC-1 α im <i>M. rectus femoris</i> von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode | 82 |

Tabelle 4.16: Relative mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Genen des Fettsäurenstoffwechsels und des Citratzyklus in der Leber von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode..... 84

Tabelle 4.17: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode 85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|---|
| 2PY | N-Methyl-2-Pyridon-5-Carboxamid |
| 4PY | N-Methyl-4-Pyridon-3-Carboxamid |
| 6HN | 6-Hydroxy-Nikotinamid |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AC | Adenylylcyclase |
| ACC/AHA | <i>American College of Cardiology/American Heart Association</i> |
| ALV | Ausdauerleistungsvermögen |
| AMPK | AMP-aktivierte Proteinkinase |
| Apo | Apolipoprotein |
| AT | Ausdauertraining |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BB | γ -Butyrobetain |
| BBD | γ -Butyrobetain-Dioxygenase |
| CACT | Carnitin-Acylcarnitin Translokase |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CD36/FAT | <i>cluster of differentiation 36/fatty acid translocase</i> , Fettsäuretranslokase |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CE | Kollisionsenergie |
| CEP | Zellkollisions-Eingangspotential |
| CETP | Cholesterinester-Transferprotein |
| CoA | Coenzym A |
| COX | Cytochrome c Oxidase |
| CPT | Carnitin-Palmitoyltransferase |
| ct | <i>cycle threshold</i> |
| CXP | Zellkollisions-Ausgangspotential |
| ddH ₂ O | Bidestilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DGAT | Diacyl-Glycerol-Acyltransferase |
| DGE | Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DP | Declustering-Potential |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescence</i> |
| EP | Eingangspotential |

| | |
|------------------|--|
| ESI | Elektronenspray Ionisierung |
| FATP | Fettsäuretransport-Protein |
| FFS | freie Fettsäuren |
| G6PD | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GLUT-4 | <i>Glucose transporter type 4</i> |
| GPx | Glutathionperoxidase |
| GSH | Glutathion |
| H ₂ O | Wasser |
| HAT | Histon-Acetyltransferase |
| HCA ₂ | <i>hydroxy-carboxylic acid receptor 2</i> |
| HDL | <i>high density lipoprotein</i> |
| HKE | Herz-Kreislauf-Erkrankungen |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HSL | Hormon-sensitive Lipase |
| IDL | <i>intermediate desity lipoprotein</i> |
| IMTG | intramuskuläre Triglyceride |
| KG | Körpergewicht |
| LCAT | Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| LKFS | langkettiger Fettsäuren |
| Lp a | Lipoprotein a |
| MAPK | <i>mitogen-activated protein kinase</i> |
| MHC | <i>myosin heavy chain</i> |
| MNA | N-Methyl-Nikotinamid |
| MRM | <i>Multiple Reaction Monitoring</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometer |
| NA | Nikotinsäure/Pyridin 3-Carboxylsäure |
| NAD | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| NADP | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NAM | Nikotinamid/Pyridin 3-Carboxylsäureamid |
| NAMPT | Nikotinamid-Phosphoribosyl-Transferase |
| NNMT | N-Methyltransferase |
| NNO | Nikotinamid-N-Oxid |
| NR | Nikotinsäureamid-Ribosid/1-(β-D-Ribofuranosyl)-1,2-dihydro-3-pyridincarboxamid |

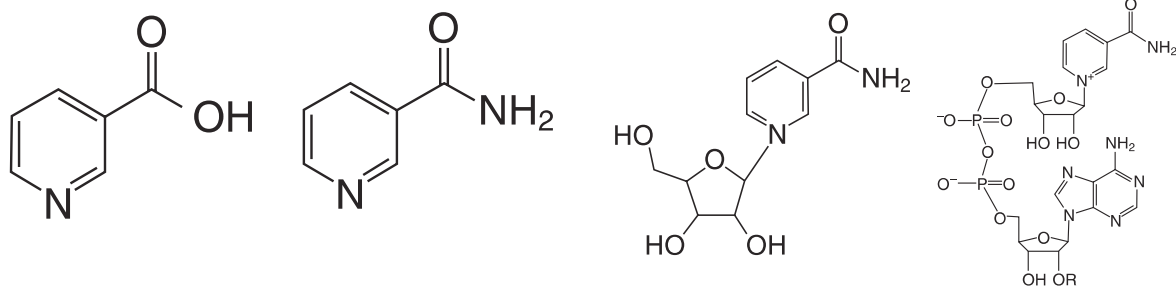
| | |
|---------------------|---|
| NTC | <i>non-template-control</i> |
| NUA | Nikotinursäure |
| NWG | Nachweisgrenze |
| OCTN | <i>novel organic cation transporter</i> |
| OXI | Oxiracetam |
| PARP | Poly(ADP-Ribose)-Polymerase |
| Parpylierung | Poly-ADP-Ribosylierung |
| PBS | phosphatgepuffertes Salzlösung |
| PDK | Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase |
| PEPCK | Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase |
| PG | Prostaglandin |
| PGC | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator</i> |
| PK | Proteinkinase |
| PPAR | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> |
| PPRE | <i>PPAR responsive element</i> |
| PRDx | Peroxiredoxin |
| RIPA | <i>Radio-Immuno-Precipitation-Assay</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| RTD-PCR | <i>Realtime-detection-Polymerase-Kettenreaktion</i> |
| RXR | Retinsäure-X-Rezeptor |
| SDHA | Succinat Dehydrogenase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Sirt | Sirtuin |
| SUR | <i>sulfonylurea receptor</i> |
| TBS | <i>Tris-Buffered-Saline-Tween</i> |
| TCA | Tricarbonsäure Zyklus |
| TG | Triglycerid |
| TML | Trimethyllysin |
| TRPV1 | <i>transient receptor potential vanilloid 1</i> |
| UPC3 | <i>uncoupling protein-3</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VLDL | <i>very low density lipoprotein</i> |
| VO ₂ max | maximale Sauerstoffaufnahme |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

1 Einleitung

1.1 Niacin – Struktur und Wirkung

Niacin ist bekannt unter dem Namen Vitamin B₃ und zählt damit zu den wasserlöslichen Vitaminen. Genau genommen wird Vitamin B₃ aber definiert über alle diätetischen Vorläufer von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD). Hierzu gehören die Nikotinsäure (Pyridin 3-Carboxylsäure, NA), das Nikotinsäureamid (Pyridin 3-Carboxylsäureamid, NAM) und das Nikotinsäureamid-Ribosid (1-(β-D-Ribofuranosyl)-1,2-dihydro-3-pyridincarboxamid, NR) (Abb. 1.1)¹. Wenn von Niacin gesprochen wird, ist korrekterweise ausschließlich die Nikotinsäure (*Nicotinic acid*= NA) gemeint. Daher wird der Begriff „Niacin“ im weiteren Verlauf der Arbeit entsprechend ausschließlich dann benutzt werden, wenn die Nikotinsäure gemeint ist.

Vitamin B₃, und damit auch Niacin, wird zum einen über die Nahrung zugeführt. Natürliche Quellen hierfür sind vor allem Fleisch, Geflügel und roter Fisch (z.B. Thunfisch oder Lachs). Zum anderen wird Niacin aber auch endogen aus Tryptophan über den Kynurenin-Weg synthetisiert (Abb. 1.2). Hierbei sind ca. 60 mg Tryptophan notwendig, um 1 mg Niacin zu synthetisieren. Die Eigensynthese des Niacins ist jedoch nicht ausreichend, um den Bedarf zu decken¹. Die empfohlene Zufuhr laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) liegt beim Menschen zwischen 11-16 mg Niacin/d².



Nicotinsäure
= „Niacin“
= NA

Nicotinsäureamid
= NAM

Nicotinsäureamid-
Ribosid
= NR

Nicotinsäureamid-
Adenin-Dinukleotid
= NAD

Abbildung 1.1: Strukturformeln von Nikotinsäure (NA), Nikotinsäureamid (NAM), Nikotinsäureamid-Ribosid (NR) und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) (modifiziert nach Present knowledge of nutrition, 10th edition, 2012)

Die lebenswichtigen Coenzyme NAD und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) können über verschiedene Wege synthetisiert werden. In der Leber entsteht aus Tryptophan über den Kynurenin-Weg das Nikotinsäure-Mononukleotid. Dieses wird in den Preiss-Handler-Weg eingespeist. Der Preiss-Handler-Weg findet in allen Geweben statt. Hier wird aus Niacin über mehrere Zwischenschritte NAD gebildet. Ebenso kann aus NAM und NR über den NAD-Salvage pathway NAD synthetisiert werden (Abb. 1.2)¹. NAD wird nachfolgend als Coenzym, als Ligand oder als Substrat (z.B. für NAD-abhängige Deacetylasen, wie Sirtuine und Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen=PARP) genutzt³. In den Reaktionen, die von Sirtuinen und PARP katalysiert werden, entsteht NAM neben 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose als Nebenprodukt. Das NAM kann über den NAD-Salvage pathway wieder zu NAD recycelt werden^{1,4}.

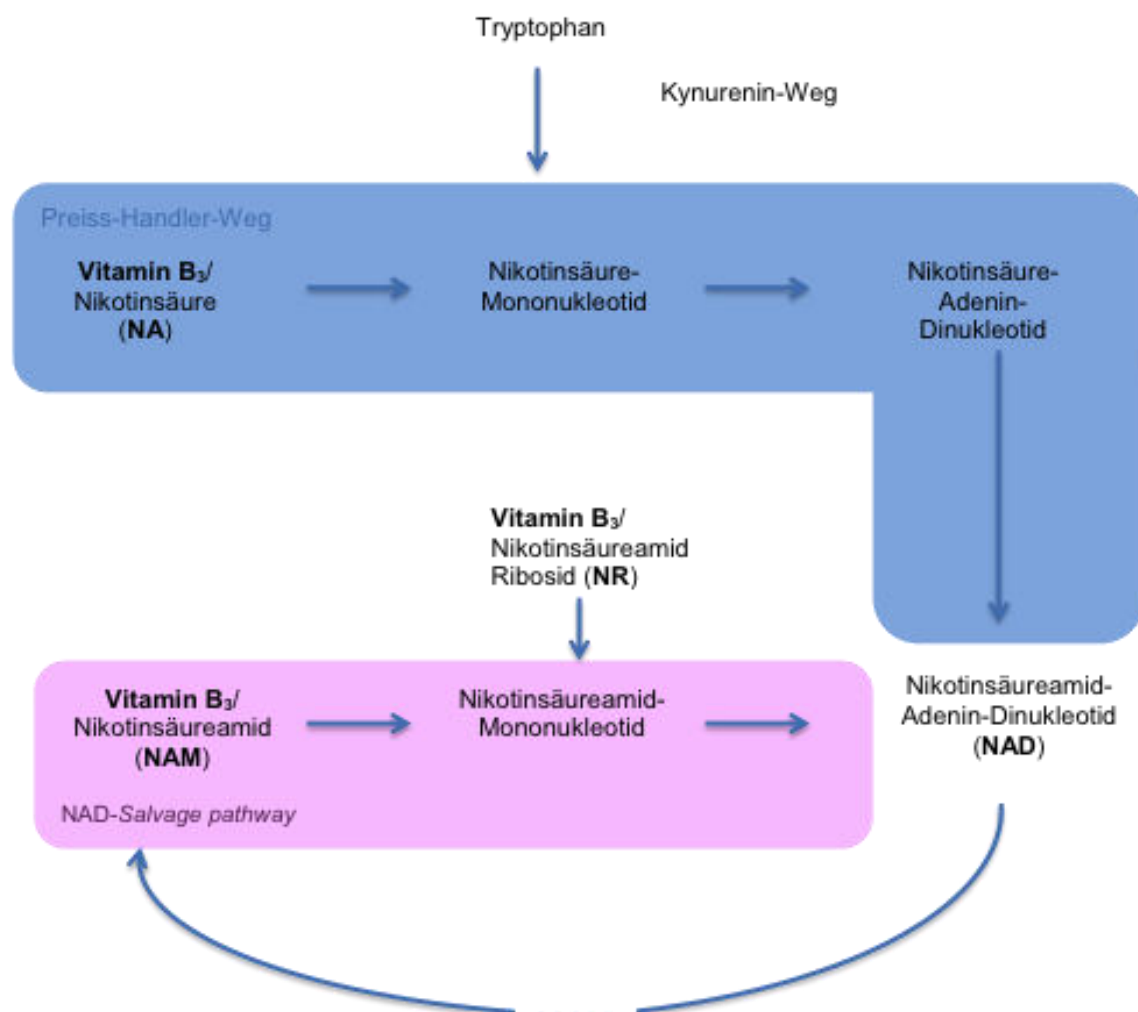


Abbildung 1.2: Synthesewege für NAD: Preiss-Handler-Weg und NAD-Salvage pathway (modifiziert nach *Present knowledge of nutrition, 10th edition, 2012*)

Das Niacin kann über drei Wege wirken: 1) als Coenzym, 2) direkt - als Ligand an seinem Rezeptor oder 3) indirekt - über die Beeinflussung verschiedener Hormone. Die erste Möglichkeit impliziert die Funktion als Vorläufer der Coenzyme NAD und NADP. Diese übertragen Elektronen und Wasserstoffmoleküle und ermöglichen dadurch viele biologische Redoxreaktionen. Daher nimmt Niacin an über 200 enzymatischen Reaktionen im Organismus teil⁵. Eine andere mögliche Wirkung des Niacins über die Beeinflussung verschiedener Hormone erfolgt Rezeptor-unabhängig. Eine Infundierung oder eine Supplementation mit NA hat erhöhte Konzentrationen von Wachstumshormonen, Adrenalin, Corticosteron und Adiponektin zur Folge⁶⁻¹¹. Diese sind bekannt dafür, dass sie Genexpressionen und zelluläre Signalgebungen in verschiedensten Geweben regulieren. Daher ist es denkbar, dass einige Effekte von Niacin auf eine veränderte Genexpression, induziert durch eine Hormonänderung während einer Niacininfundierung oder Nicainsupplementierung, zurückzuführen sind¹². Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Wirkung des Niacins und erfolgt über die Bindung an seinen Rezeptor. Dies wird im Weiteren genauer erläutert.

1.2 Wirkung des Niacins in pharmakologischen Konzentrationen

In pharmakologischen Dosen von 1-2 mg/d ist Niacin beim Menschen in der Lage *low density lipoprotein*-Cholesterin (LDL-C) und Triglyceride (TG) zu senken und *high density lipoprotein*-Cholesterin (HDL-C) im Blut zu erhöhen. Dadurch wird es häufig zur Senkung erhöhter Lipidkonzentrationen im Blut eingesetzt, die einen bedeutenden Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ausmachen^{13,14}. Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen heutzutage die weltweit häufigste Todesursache dar. Allein im Jahr 2012 starben weltweit geschätzt 17,5 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen¹⁵. Diese Zahl wird laut Schätzungen der *World Health Organization* (WHO) bis 2030 auf 25 Millionen ansteigen¹⁶. Eine der Hauptursachen der den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugrundeliegenden Artherosklerosen sind Dyslipoproteinämien. Dyslipoproteinämien fassen Fettstoffwechselstörungen wie Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie und gemischte Hyperlipidämie-Formen zusammen. Diese sind durch Änderungen in der Konzentration und/oder

Änderungen in der Komposition eines oder mehrerer Lipoproteine im Plasma gekennzeichnet¹⁷. Aus diesem Grund ist die Absenkung dieser erhöhten bzw. in ihrer Zusammensetzung veränderten Lipoproteine im Plasma eine wichtige Maßnahme zur Senkung der Mortalität von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Neben der Verhaltens- und Ernährungstherapie bei Übergewicht und Adipositas wird die medikamentöse Therapie als wirkungsvolles Mittel eingesetzt, um Plasmalipide, vor allem die TG, zu senken. Die weltweit häufigsten Medikamente, die sich derzeit zur Therapie von Dyslipoproteinämien im Einsatz befinden, sind Statine, Fibrate und Niacin^{18,19}. Laut den Richtlinien des ACC/AHA (*American College of Cardiology/American Heart Association*) sind Statine bei pathologischen Cholesterinwerten das Mittel der Wahl zur primären und sekundären Prävention von artherosklerotischen Herzkrankheiten²⁰. Nicht-Statins-basierte Therapien, wie Niacin, Fibrate, omega-3-Fettsäuren, Gallensäurebinder und Cholesterin-Absorptionshemmer, wurden bisher in der Kombination mit Statinen empfohlen, um die Konzentration des LDL-C und der TG im Plasma zu senken, sowie die HDL-C-Konzentration im Plasma zu erhöhen²¹. Ein Grund die Nicht-Statins-basierte Therapie als Monotherapie einzusetzen ist die Muskeltoxizität der Statin-Präparate, die in 10-20 % der mit Statinen behandelten Fälle auftritt, einhergehend mit Myositis oder sogar Rhabdomyolyse. Hier ist der Einsatz von alternativen lipidsenkenden Medikamenten erforderlich²². Während der Wirkmechanismus von Statinen und Fibraten weitgehend aufgeklärt ist, ist die lipidsenkende Wirkung des Niacins bisher nur sehr unzureichend bekannt.

Es ist davon auszugehen, dass der antilipolytische Effekt des Vitamin B₃ nicht auf dessen Coenzymfunktion zurückzuführen ist. Dafür spricht, dass durch NAM die Inhibierung der peripheren Lipolyse nicht vermittelt werden kann^{1,23,24}. Auch können NAM und NR nicht an den Niacin-Rezeptor binden^{13,25}. Der Niacin-Rezeptor (*hydroxy-carboxylic acid receptor 2* = HCA₂ ehemals GPR19a, bzw. bei der Maus PUMA-G) ist ein G_i-Protein gekoppelter Rezeptor, der vor allem im Fettgewebe, aber auch in geringerer Expression in vielen anderen Geweben vorkommt^{26,27}. Liganden, die an den HCA₂ binden, sind vor allem durch eine Carboxylgruppe charakterisiert²⁵. Da Niacin eine Säure ist und eine Carboxylgruppe aufweist (siehe Abb. 1.1), kann sie an den Rezeptor binden. NAM und NR sind hingegen Amide, die eine Aktivierung des Rezeptors nicht oder nur in äußerst hohen Konzentrationen induzieren^{13,23,28}.

Ein Erklärungsansatz für die lipidsenkende Wirkung des Niacins ist die Hemmung der peripheren Lipolyse in den Adipozyten. Dieser Erklärungsansatz basiert auf einer Rezeptor-vermittelten Wirkung des Niacins durch Bindung an seinen Rezeptor. Diese Bindung von Niacin an den HCA₂-Rezeptor bewirkt eine Inhibierung der Adenylatcyclase (AC), wodurch verminderte cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentrationen vorliegen. Normalerweise würde cAMP zu einer Aktivierung der Proteinkinase (PK) A führen. Die PKA phosphoryliert eine Reihe von Proteinen, dazugehörend auch die Hormon-sensitive Lipase (HSL) und Perilipin, welche für die Hydrolyse von TG in den Adipozyten notwendig sind. Die Phosphorylierung des Perilipin erlaubt den Zugang zu den TG-enhaltenden Lipidtröpfchen, sodass die Funktion der phosphorylierten HSL erleichtert wird. Durch die Bindung des Niacins an seinen Rezeptor wird jedoch die cAMP-Konzentration erniedrigt und die nachfolgende Kaskade läuft nicht ab, wodurch sich der antilipolytische Effekt des Niacins ergibt^{14,19}. Das Angebot an freien Fettsäuren (FFS) in der Leber ist somit verringert. Da diese für die Bildung von TG in der Leber benötigt werden, vermindert sich sowohl die Bildung als auch folgend die hepatische Sekretion dieser, in Form von *very low density lipoprotein* (VLDL)-Partikeln, ins Blut^{29,30}. Der Rezeptor-abhängige Mechanismus dieses lipidsenkenden Effektes ist zumindest teilweise bestätigt, da gezeigt werden konnte, dass in Mäusen, denen der Rezeptor fehlte, keine Niacin-induzierte Senkung der Plasma-FFS-Konzentrationen zu beobachten war²⁸.

Die lipidsenkende Wirkung des Niacins kann jedoch nicht ausschließlich auf die Hemmung der peripheren Lipolyse zurückgeführt werden. Grund dafür ist das Bestehenbleiben der TG-senkenden Wirkung des Niacins, obwohl gleichzeitig zu beobachten ist, dass die Konzentrationen an FFS im Blut während einer Langzeittherapie mit Niacin aufgrund des ausgeprägten *Rebound*-Effektes sogar bis über das Ausgangsniveau ansteigen können³¹. In manchen Studien, die die Wirkung von Niacin betrachten, erfolgte eine einmalige Niacingabe, sodass zu einem Zeitpunkt sehr hohe Niacin-Konzentrationen vorlagen^{32,33}. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch Niacin über das Futter verabreicht, sprich die Niacingabe erfolgt kontinuierlich und über den Tag verteilt, sodass keine Spitzen einer hohen Niacin-

Konzentration, wie bei einer einmaligen Niacingabe, zu erwarten sind. Eine Studie mit einer chronischen Niacingabe über eine Infundierung bei Ratten ergab, dass der *Rebound*-Effekt nach etwa 7 h auftrat, was bedeutet, dass auch bei kontinuierlicher Niacinaufnahme ein *Rebound*-Effekt auftritt³⁴.

Bleibt zu klären, wie der *Rebound*-Effekt der FFS-Konzentration im Plasma, der auf eine Niacinsupplementierung folgt, entsteht. Oh *et al.* (2011) konnten zeigen, dass in den ersten 5 h nach Beginn der Niacin-Infundierung die Niacin-Infusion initial in der Lage war die FFS-Konzentrationen zu senken, wohingegen nach 24 h die FFS-Konzentrationen trotz fortwährender Niacin-Infundierung auf Ausgangsniveau anstiegen. Interessanterweise zeigte sich nach Beendigung der Niacin-Infundierung ein weiterer Anstieg der FFS-Konzentrationen im Plasma auf mehr als das doppelte, sodass daraus geschlussfolgert werden kann, dass auch in der späten Phase der Niacin-Infundierung der inhibierende Effekt des Niacins vorhanden ist³⁴. Außerdem wirkte eine Niacin-Gabe über den Tumornekrosefaktor- α , und nachfolgend auch über andere Cytokine, wie Interleukin-6, lipolytisch. Dies resultiert in erhöhten FFS-Konzentrationen, wie sie bei einer Langzeittherapie mit Niacin zu beobachten sind^{35,36}.

Ein weiterer Ansatz zur Klärung des lipidsenkenden Wirkmechanismus von Niacin ist dessen starke inhibitorische Wirkung auf die hepatische Diacyl-Glycerol-Acyltransferase (DGAT)-2. Die DGAT-2 katalysiert einen maßgeblichen Schritt in der TG-Synthese, sodass bei einer Niacin-Gabe die TG-Synthese gehemmt wird³⁷. Auch konnte durch eine 24-stündige Niacin-Infusion die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK)-Aktivität drastisch erniedrigt werden. Dieses Enzym spielt nicht nur im Rahmen der Gluconeogenese eine Rolle, sondern auch in der Glyceroneogenese. Durch die Bereitstellung von Glycerol-3-Phosphat durch die von der PEPCK-katalysierten Reaktion können nachfolgend FFS revereestert bzw. TG neu gebildet werden. Dieses Geschehen kann durch die Niacin-Infundierung gemindert werden, was in niedrigen TG-Konzentrationen resultiert³⁶. Zudem wird durch die verminderte TG-Synthese die hepatische Sekretion Apolipoprotein (Apo) B-enthaltender artherogener Lipoproteine gesenkt. Dadurch ist der Abbau von Apo B erhöht und letztlich sind die Apo-B enthaltenden Partikel wie VLDL und Lipoprotein a (Lp a) reduziert^{37,38}. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die durch Niacin-

vermittelte verminderte Bereitstellung der FFS für die TG-Synthese in der Leber, die hepatische Expression von ApoC3 unterdrückt. Das verminderte Vorliegen von ApoC3 im Plasma führt zu einer reduzierten Produktion und einem erhöhten Umsatz von VLDL. Folglich wird dessen Konzentration im Plasma vermindert^{38,39}. Während die Bildung der VLDL vom hepatischen TG-Status abhängig ist, wird die Bildung der *intermediate density lipoproteins* (IDL) und LDL vom Grad der VLDL-Bildung bestimmt. Als Konsequenz dieser sequenziellen Lipoproteinbildung mindert eine Niacintherapie nicht nur die TG-Synthese, sondern nachfolgend auch die Konzentrationen der zirkulierenden VLDL, IDL und LDL^{37,40,41}.

Der Einfluss des Niacins auf erhöhte HDL-Konzentrationen wird unter anderem dadurch erklärt, dass Niacin in der Lage ist, den hepatischen apo A-I-Katabolismus zu hemmen, wodurch die Halbwertszeit des HDL erhöht wird und damit auch dessen Konzentration⁴². Es ist außerdem möglich, dass der verminderte TG-Gehalt der apo-B-enthaltenden Lipoproteine in einem verminderten Austausch von TG gegen Cholesterinester durch das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) aus den HDL-C-Partikeln resultiert¹⁴. Le Bloc'h *et al.* (2015) konnten zudem zeigen, dass Niacin die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verstärkt aktiviert. Die LCAT liegt an HDL-Partikel assoziiert vor und vermittelt die Veresterung von Cholesterin im Plasma. Eine verstärkte Aktivierung hat erhöhte HDL-C-Konzentrationen zur Folge⁴³. Des Weiteren stellte sich heraus, dass Niacin die Expression des *ATP-binding cassette transporter 1* erhöht und damit der HDL-vermittelte Cholesterinefflux verstärkt werden kann^{44,45}.

Die Verwendung von Niacin in pharmakologischen Dosierungen kann vor allem zwei Nebenwirkungen nach sich ziehen. Die eine Nebenwirkung ist das *Flushing*-Syndrom. Sie wird Rezeptor-abhängig über die Bindung des Niacins an den HCA₂ vermittelt und tritt vor allem bei *immediate release*-Präparaten auf. Das *Flushing*-Syndrom ist eine biphasische Erhöhung des dermalen Blutflusses. Es wird in der ersten Phase über die Aktivierung des HCA₂-Rezeptors in den dermalen Langerhans-Zellen, in der zweiten Phase durch die Aktivierung des HCA₂-Rezeptors in den Keratinozyten vermittelt. Die Folge ist eine verstärkte Bildung und Freisetzung der Prostanoiden Prostaglandin (PG)D₂ und PGE₂, bzw. nur PGE₂. Durch deren

dilatierende Eigenschaft weiten sich die dermalen Blutgefäße und die charakteristische Hautrötung erscheint^{46,47}.

Die andere Nebenwirkung ist die Hepatotoxizität. Diese wird klinisch über erhöhte Transaminase-Werte im Blut oder symptomatisch durch Fatigue, Übelkeit und Erbrechen sichtbar. Die Hepatotoxizität erklärt sich daraus, dass Niacin vor allem in der Leber metabolisiert wird. Das kann über zwei Wege geschehen. Über den ersten Weg werden vor allem *immediate release*-Präparate verstoffwechselt (Abbildung 1.3). Dieser beinhaltet die Konjugation mit Glycin, woraufhin Nikotinursäure entsteht und ist durch eine hohe Affinität, aber eine geringe Kapazität gekennzeichnet. Der zweite Weg ist charakterisiert über eine geringe Affinität, aber hohe Kapazität. Vor allem über diesen zweiten Weg werden die *sustained release*-Präparate abgebaut. Er führt zur Bildung von Nikotinamid und anschließend NAD und anderen Metaboliten (6-Hydroxynikotinamid, Nikotinamid-N-Oxid, N-Methyl-Nikotinamid), von denen die zuletzt genannten eine toxische Wirkung haben (Abbildung 1.3)^{14,48–50}.

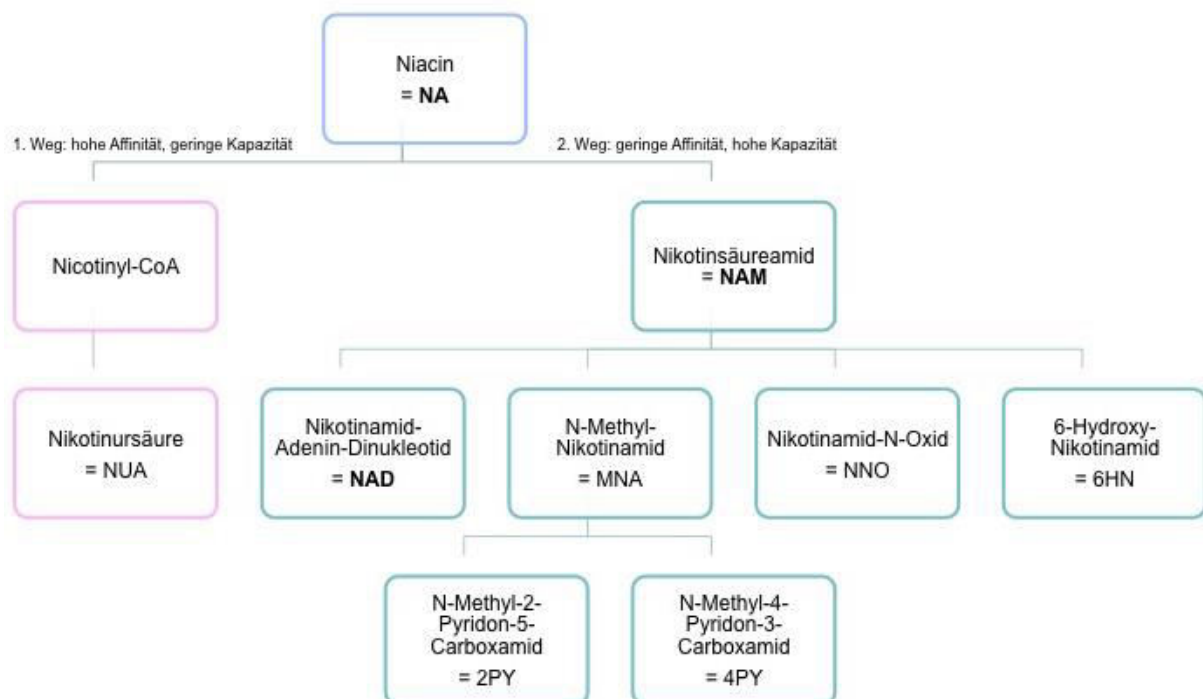


Abbildung 1.3: Biotransformation von Niacin (modifiziert nach Chapman *et al.* 2010)

Wie anhand der lipidsenkenden Wirkung von Niacin gezeigt werden kann, sind nicht alle Effekte des Niacins Rezeptor-vermittelt. In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass der Niacinrezeptor in bestimmten Geweben sehr stark exprimiert wird (z.B. Fettgewebe, Leber), wohingegen er in anderen nur schwach exprimiert ist oder gar nicht vorkommt. In der Skelettmuskulatur wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass dort kein Rezeptor vorliegt, obwohl aus der Literatur hervorgeht, dass Niacin eine Wirkung in der Skelettmuskulatur hat⁵¹⁻⁵⁴. Nach neuesten Erkenntnissen kommt der HCA₂ in der Muskulatur aber zumindest schwach exprimiert vor^{26,27,55}. Es bleibt allerdings unklar, ob dieses schwache Vorkommen des Niacinrezeptors verantwortlich ist für die Wirkung des Niacins auf die Skelettmuskulatur oder ob die Wirkung des Niacins in der Skelettmuskulatur auch unabhängig vom Niacinrezeptor zustande kommt.

Um die bekannten Effekte, die Niacin auf die Skelettmuskulatur hat, genauer zu beschreiben, werden zunächst Grundlagen des Aufbaus und der Energieversorgung, die wichtig für die kontraktile Eigenschaften des Muskels sind, geklärt.

1.3 Skelettmuskulatur – Aufbau und Funktion

Ein Skelettmuskel setzt sich aus zahlreichen Muskelfaserbündeln zusammen. Diese enthalten Muskelfasern, die einen Durchmesser von 10-80 µm haben. Eine Skelettmuskelfaser ist eine vielkernige Zelle, die aus der Fusion von einkernigen Vorläuferzellen, den Myoblasten, entsteht. Eine Muskelfaser besteht aus vielen Myofibrillen. Diese sind etwa 1-2 µm dick. Durch Zwischenwände, die Z-Scheiben, werden diese in hunderte 2-2,5 µm lange Fächer, auch Sarkomere genannt, unterteilt. Als Sarkomer bezeichnet man dabei die kleinste kontraktile Einheit des Muskels. Kontraktile Proteine im Sarkomer sind Aktin und Myosin. Die gestreifte Struktur erhält der Muskel, da sich innerhalb zweier Z-Scheiben die dicken Myosinfilamente und die dünnen Aktinfilamente überlappen^{56,57}. Das Myosin besteht aus 2 schweren und 4 leichten Ketten. Die Myosinschwerketten (*myosin heavy chain* = MHC) sind die am häufigsten vorkommenden Proteine im Skelettmuskel mit einem Anteil von bis zu 25 % bezogen auf den gesamten Proteinanteil. Sie sind hauptsächlich verantwortlich für die Kontraktionskraft des Muskels. Unterscheiden

kann man die verschiedenen Muskelfasertypen dadurch, dass sie unterschiedliche MHC-Isoformen besitzen⁵⁸.

Die Skelettmuskulatur macht einen wesentlichen Anteil des Organismus aus. So kann beim Menschen die Skelettmuskulatur bis zu 40 % der Körpermasse betragen. Zudem ist sie eines der metabolisch aktivsten Gewebe im Körper⁵⁹. Der Phänotyp des Skelettmuskels wird charakterisiert durch eine Kombination verschiedener Eigenschaften des Muskels. Dazu gehören der Metabolismus verschiedener Energiesubstrate, die Resistenz gegenüber Ermüdung, die Innervation, die Expression kontraktiler Proteine und die Farbe⁵⁸. Die Typ I-Fasern erscheinen rot, die Typ IIx- und die Typ IIb-Fasern weiß, während die Typ IIa-Fasern eine Mischung aus weißen und roten Fasern zeigen. Diese Farbunterschiede reflektieren die Kapazität des Sauerstofftransports mittels Myoglobin. Die Kapazität des Sauerstofftransports korreliert positiv mit der Mitochondriendichte und spiegelt sich in der oxidativen Kapazität wider⁶⁰. Die *Slow-twitch* (Typ I) Muskelfasern haben einen hohen Mitochondriengehalt und einen oxidativen Metabolismus, da sie als hauptsächliche Energiequelle Fettsäuren verwerten. Im Gegensatz dazu generieren die *Fast-twitch* Muskelfasern, dazu gehörend Typ IIa, Typ IIb und Typ IIx, Adenosin-triphosphat (ATP) vor allem durch die Glykolyse. Muskeln, die reich an Muskelfasern des Typ II sind, sind empfindlicher gegenüber Ermüdung. Das ist teilweise auf ihren glykolytischen Metabolismus, der eine Übersäuerung hervorrufen kann, zurückzuführen. Die Kontraktionskraft der Typ II Fasern steigt von Typ IIa < IIx < IIb an⁶¹. Die verschiedenen Muskelfasertypen synthetisieren eine Reihe von Muskelfasertyp-spezifischen kontraktilen Proteinen, regulatorischen Proteinen und Enzymen^{62,63}.

1.4 Energieversorgung der Skelettmuskulatur

Während eines Trainings stehen, abhängig von Intensität und Dauer, Fettsäuren und Glycogen als Energiequellen für die Muskulatur zur Verfügung. Sie gelten als limitierende Quelle für das Ausdauerleistungsvermögen. Die Fettsäuren kommen aus der Lipolyse im Fettgewebe oder aus den intramuskulären TG (IMTG)-Speichern⁶⁰.

Bei einer niedrigen bis moderaten Intensität des Ausdauertrainings sind Lipide die primäre Energiequelle, die den Skelettmuskel versorgt. Eine weitere Energiequelle stellt aber auch Glucose aus der hepatischen Glykolyse (oder Glukoneogenese) dar. Bei steigender Intensität nimmt die Verwertung von zirkulierenden FFS ab, wohingegen der Verbrauch von Glucose zunehmend ansteigt. Bei hohen Intensitäten stellt Glucose dann die Hauptenergiequelle dar und die Glycogenspeicher im Muskel werden abgebaut^{60,64}.

Wird die Dauer des Ausdauertrainings betrachtet, so sind zuerst Kohlenhydrate die Hauptenergiequelle und weniger Lipide. Mit anhaltendem Training im moderaten oder submaximalen Bereich wird die Lipidoxidation wichtiger und der Anteil der Kohlenhydrate als Energiequelle nimmt ab. Dies geht damit einher, dass in der späten Phase des Trainings ein Anstieg der Plasma-FFS-Konzentrationen zu beobachten ist, was aus einer vermehrten Mobilisierung von Fetten aus dem Fettgewebe resultiert. Dieser Anstieg der FFS-Plasmakonzentration führt zu einer vermehrten Aufnahme von Fettsäuren in den Skelettmuskel und ist wichtig, um die Laktatproduktion zu reduzieren und somit die Ermüdung des Muskels hinauszuzögern⁶⁵. Außerdem sind die IMTG-Speicher bei anhaltendem Training als Energiequelle von großer Bedeutung. Diese liegen relativ nah bei den Mitochondrien, sodass die β -Oxidation, durch die nahe Lokalisation, vereinfacht wird. Durch Ausdauertraining kann die Dichte dieser Lipidtröpfchen als Anpassung an Belastung erhöht werden. Mit anhaltender Dauer des Ausdauertrainings reduzieren sich die IMTG-Speicher vor allem in den Typ I-Fasern um bis zu 60 %, was die große Bedeutung dieser Speicher als Energiequelle widerspiegelt^{60,64}. Weiterhin kann durch Ausdauertraining im submaximalen Bereich die Fettsäureoxidation erhöht werden. Der maximale Anteil der Fettsäureoxidation liegt bei Intensitäten von 59 - 64 % (moderate Intensität) der maximalen Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) bei trainierten und von 47 - 52 % bei untrainierten Individuen⁶⁵.

1.5 Veränderung des metabolischen Muskelphänotyps durch Ausdauertraining und Niacinsupplementierung

Ausdauertraining induziert eine Anpassung des Muskels an die Belastung. Dies zeigt sich in verschiedenen physiologischen Veränderungen, inklusive einer Verschiebung des Muskelfasertyps von glykolytischen zu oxidativen Fasern, einer erhöhten Mitochondrienbiogenese und einer verbesserten oxidativen Kapazität^{60,62}. Durch diese Adaptionen wird die Ausdauerleistungsfähigkeit verbessert. Die Ausdauerleistungsfähigkeit ist die Fähigkeit möglichst lange den Punkt der Ermüdung hinauszuzögern. Ein leistungsbegrenzender Faktor bei Ausdauersport ist die Sauerstoffaufnahme. Aufgrund dessen ist die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) ein guter Parameter das Ausdauerleistungsvermögen zu messen.

Die Induktion des *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) δ und des *PPAR γ co-activator* (PGC)-1 α spielen bei der Veränderung des metabolischen Muskelphänotyps eine zentrale Rolle. PPAR δ ist dabei einer von insgesamt drei PPAR-Isotypen (PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ)⁶³. Diese gehören zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und wirken als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren. Sie werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. In der Skelettmuskulatur ist PPAR δ die vorherrschende Isoform⁶⁶. Bindet ein Ligand an den PPAR δ , so erfolgt die Bildung eines Heterodimers mit einem anderen nukleären Rezeptor, beispielsweise dem Retinsäure-X-Rezeptor (RXR), wodurch ein aktiver Transkriptionsfaktorkomplex entsteht (siehe Abbildung 1.4). Liganden für PPAR δ können verschiedene Substanzen, wie Fettsäuren oder Metabolite von Fettsäuren, sein. Der aktive Transkriptionsfaktorkomplex assoziiert mit den transkriptionellen Co-Aktivatoren und bindet an Sequenz-spezifische *PPAR responsive elements* (PPREs) in der Promotorregion von Zielgenen, wodurch deren Transkriptionsrate gesteigert wird. Im Zuge dessen dissoziieren auch Co-Repressoren ab und Protein-Komplexe, die eine Histon-Acetyltransferase (HAT)-Aktivität aufweisen, werden rekrutiert. Die Acetylierung vermittelt eine Veränderung der Chromatinstruktur. Dies führt zu einem verbesserten Zugang zu den Zielgenen (siehe Abbildung 1.4). Das Zusammenspiel der Co-Aktivatoren/-Repressoren und der HAT reguliert verschiedene metabolische Wege, inklusive der Lipidbiosynthese und dem Glucose-Metabolismus⁶⁷⁻⁶⁹.

PGC-1 α ist einer der Co-Aktivatoren, die für eine maximale Aktivität des PPAR/RXR-Heterodimeres notwendig sind. Dem PGC-1 α ist es möglich, mit allen drei PPAR-Isotypen zu interagieren und so die Transkription von PPAR-Zielgenen zu aktivieren. Dies geschieht durch eine Modifizierung der Chromatinstruktur und einer damit einhergehenden erleichterten Bildung des PPAR/RXR-Heterodimeres⁷⁰. Die Expression von PGC-1 α wird im Muskel sowohl durch einen akuten Trainingsreiz, als auch durch langfristiges Ausdauertraining induziert⁷¹. Transgene Mäuse, die PGC-1 α überexprimieren, zeigen eine erhöhte Expression von Markern der langsamen Typ I-Fasern, wie die Cytochrome c Oxidase (COX) II und die COX IV, in Muskeln, die ursprünglich einen höheren Anteil von Typ II-Fasern enthielten. In muskelspezifischen PGC-1 α *knock-out* Mäusen ist hingegen eine umgekehrte Verschiebung zu beobachten. Zudem weisen die transgenen PGC-1 α Mäuse eine verspätete Ermüdung auf, während die PGC-1 α *knock-out* Mäuse eine verminderte Ausdauerleistungsfähigkeit zeigen^{63,72}. Weiterhin konnten sowohl eine Überexpression, als auch eine durch Ausdauertraining induzierte gesteigerte Expression von PPAR δ und PGC-1 α eine Veränderung des Muskelfaserverhältnisses von glykolytischen hin zu oxidativen Muskelfasern verursachen^{73,74}. Bei PGC-1 α transgenen Mäusen wurde weitergehend auch eine vermehrte Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung, des Tricarbonsäurezyklus und der Fettsäureoxidation festgestellt⁷⁴. Der Fettsäuretransport im Skelettmuskel durch die Fettsäuretranslokase (*cluster of differentiation 36*=CD36 oder *fatty acid translocase*=FAT) und das Fettsäuretransport-Protein (*fatty acid transport protein*=FATP), die jeweils ein PPRE in ihrer Promotorregion enthalten, ist bei einer Überexpression von PGC-1 α um das 2-5fache erhöht^{75,76}. Außerdem wird durch die vermehrte Expression des PGC-1 α die maximale Sauerstoffaufnahme um bis zu 24 % verbessert. Ermüdungserscheinungen treten deshalb später auf⁷¹. Eine mögliche Erklärung dafür ist die durch PPAR δ und PGC-1 α im Skelettmuskel stimulierte Biogenese von Mitochondrien und die dadurch verbesserte Mitochondrienfunktion^{74,77}. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei transgenen Mäusen, die PGC-1 β überexprimieren. Infolge einer vermehrten Expression mitochondrialer Gene und einer Verschiebung des Faserverhältnisses zu den eher oxidativen Typ IIx Fasern, kommt es zu einer erhöhten Ausdauerleistungsfähigkeit⁷⁸.

Für PGC-1 α ist zusätzlich bekannt, dass er durch Induzierung von angiogenen Faktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) A und B die Angiogenese stimuliert^{79,80}. Ebenso ist die Angiogenese eine Adaption bei Ausdauertraining⁸¹. Darüber hinaus ergibt sich für den Muskel der Vorteil, dass die Versorgung mit Sauerstoff und Energiesubstraten verbessert wird⁸².

PPAR δ , PGC-1 α und PGC-1 β sind deshalb im Muskel von großer Bedeutung, da sie nicht nur eine Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung induzieren, sondern auch den Muskelphänotyp beeinflussen. Das bedeutet, dass eine erhöhte Kapazität der Fettsäureoxidation in diesen Muskeln gegeben ist, wodurch sich die Ausdauerleistungsfähigkeit positiv entwickelt.

Auch Niacin hat einen Einfluss auf den metabolischen Muskelphänotyp und die Muskelfaserzusammensetzung. Watt *et al.* (2004) konnten zeigen, dass durch die Gabe von Niacin bei normalgewichtigen Probanden eine Induktion des PPAR δ und des PGC-1 α in der Skelettmuskulatur hervorgerufen wird. Das Ausmaß dieser Induktion ist hierbei mit der von Ausdauertraining vergleichbar⁵¹. Auch bei verschiedenen Tierarten hatte die Supplementierung von Niacin einen Effekt auf den metabolischen Phänotyp der Skelettmuskulatur. So konnte beim Schwein und beim Schaf die Verabreichung von Niacin eine Veränderung der Muskelfaserverteilung hin zum oxidativen Muskelfasertyp bewirken^{53,54}. Ferner konnten erhöhte mRNA-Konzentrationen von PGC-1 β beim Schwein und von PGC1 α , PGC-1 β und PPAR δ beim Schaf als Hauptregulatoren der Muskelfaserveränderung hin zum oxidativen Muskelfasertyp gezeigt werden. Damit einhergehend zeigten sich bei den Genen des Fettsäurestoffwechsels und der Angiogenese erhöhte mRNA-Konzentrationen, die durch die Niacin-Supplementierung induziert wurden^{53,54}.

Weiterhin konnte bei fettleibigen Zuckerratten durch eine Niacinsupplementierung eine Erhöhung des Typ I-Fasergehalts und eine Verminderung des Typ II-Fasergehalts induziert werden. Wie bei den Studien an Schaf und Schwein waren auch hier die mRNA-Konzentrationen von Genen des Fettsäuretransports, der mitochondrialen Fettsäureaufnahme, der β -Oxidation und der oxidativen Phosphorylierung erhöht⁵². Beim Schaf und bei den Zuckerratten konnten weiterhin erhöhte Transkriptkonzentrationen von angiogenen Faktoren durch eine Niacin-Supplementierung gezeigt werden^{52,53}.

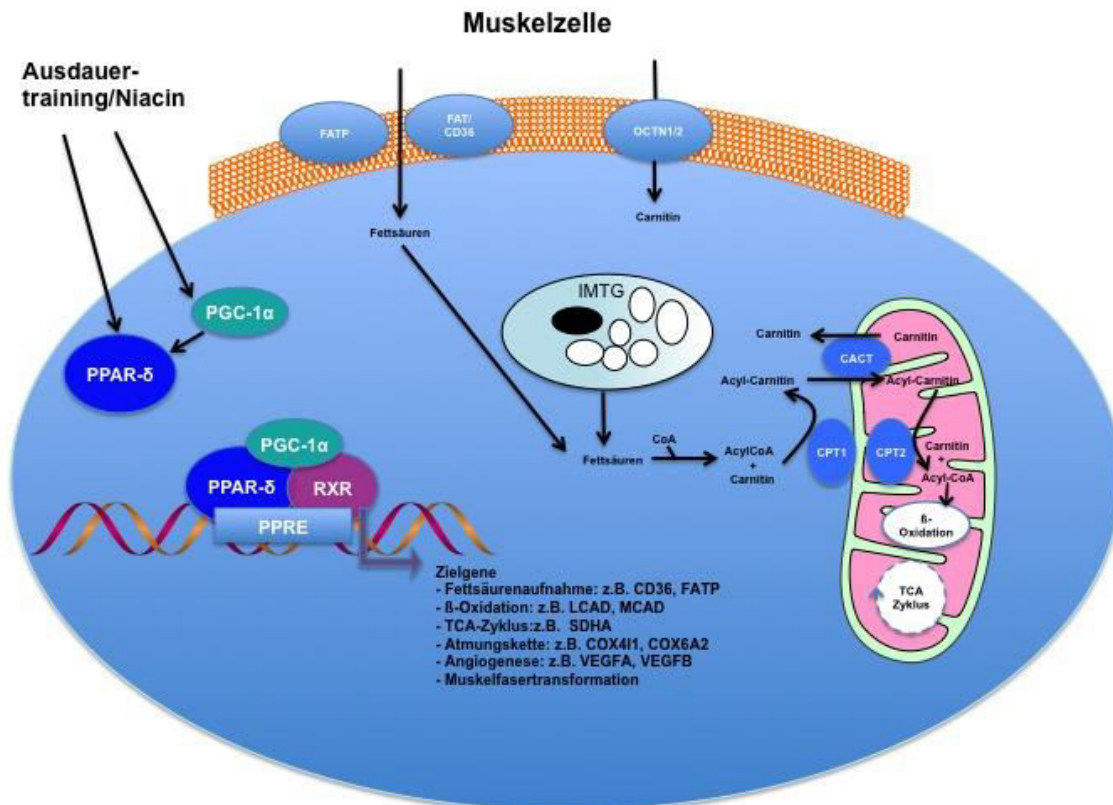


Abbildung 1.4: Einfluss von Ausdauertraining und Niacin auf die Muskelzelle. CACT=Carnitin-Acyl-Carnitin Carrier, CPT1/2=Carnitin Palmitoyltransferase, COX411=Cytochrom c Oxidase Untereinheit IV Isoform I, COX6A2=Cytochrom c Oxidase Untereinheit Via Polypeptid 2, FAT/CD36=Fettsäuren-Translokase, FATP=Fettsäuren Transportprotein, IMTG=Intramuskuläre Triglyceride, OCTN=Novel organic cation transporter, PGC-1α=Peroxisome proliferator-activated receptor delta co-activator 1α, PPARδ=Peroxisome proliferator-activated receptor δ, PPRE=PPAR responsive elements SDHA=Succinat Dehydrogenase, TCA Zyklus=Tricarbonsäure Zyklus

1.6 Effekte von Niacin auf die Leber

In der Leber sind außerdem Effekte des Niacins auf den Carnitinstatus und damit auf die β-Oxidation bekannt. Die β-Oxidation von Fettsäuren ist stark durch Carnitin reguliert, da die langkettigen Fettsäuren (LKFS) nur Carnitin-gebunden, in Form von Acyl-Carnitin, in die innere Mitochondrienmembran gelangen können, wo sie oxidiert werden. In übergewichtigen Ratten konnte gezeigt werden, dass der durch Übergewicht gestörte Carnitinstatus mithilfe einer Niacingabe normalisiert werden kann. Eine wichtige Rolle dabei spielt PPARα, dessen durch Übergewicht gestörte Funktion ursächlich für den verschlechterten Carnitinstatus ist⁸³. Die verminderte

PPAR α -Funktion führt zu einer verminderten Kapazität der Leber Carnitin zu synthetisieren und aufzunehmen. Wird Niacin supplementiert, kann der PPAR α aktiviert werden, woraufhin bei übergewichtigen Zuckerratten erhöhte Carnitin-Konzentrationen in der Leber zu sehen waren⁸³.

Es besteht daher die Möglichkeit, dass auch in der Muskulatur ähnliche Effekte von Niacin auf den Carnitinstatus und damit eine verbesserte β -Oxidation vorhanden sind, die sich in einer verbesserten Ausdauerleistungsfähigkeit widerspiegeln können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass regelmäßiges Ausdauertraining, welches ebenso eine Aktivierung der PPARs zur Folge hat, in der Lage ist, verminderte Carnitin-Konzentrationen, induziert durch eine *High-Fat* Diät in übergewichtigen Mäusen, wieder zu normalisieren. Auch hier wird über die Aktivierung der PPARs und der PPAR Co-Aktivatoren die hepatische Carnitin-Aufnahme und -Synthese gesteigert⁸⁴. Eine Kombination aus Niacinsupplementierung und Ausdauerleistungsfähigkeit über einen veränderten Carnitinstatus in der Leber und/oder in der Muskulatur und damit eine verbesserte β -Oxidation und Energiebereitstellung für den Muskel könnte sich daher positiv auf die Ausdauerleistungsfähigkeit auswirken.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich, wie laut vorhergehender Literatur, die durch eine hohe Niacinsupplementierung nachgewiesene Erhöhung des Typ I-Muskelfaseranteils und die damit verbundene Veränderung des metabolischen Phänotyps der Muskulatur positiv auf die Ausdauerleistungsfähigkeit auswirkt.

Ähnliche Veränderungen in der Muskelfaserzusammensetzung und im Muskelphänotyp wie sie durch Niacinsupplementierung ausgelöst werden, sind auch als Adaptionen an regelmäßiges Ausdauertraining sichtbar. Zugleich ist eine Veränderung der kontraktiven Eigenschaften des Muskels, erkennbar durch mehr MHC I-Fasern und weniger MHC II-Fasern, zu beobachten. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung der kontraktiven Proteine des Muskels gehen, ebenso wie bei einer hohen Niacinsupplementierung, mit einem eher oxidativen Muskelphänotyp einher. Da diese Adaptionen der Muskulatur an regelmäßiges Ausdauertraining eine höhere Ermüdungsresistenz zur Folge haben, ist die Ausdauerleistungsfähigkeit verbessert.

Die Ausdauerleistungsfähigkeit des Organismus kann über die $VO_2\text{max}$ bestimmt werden⁸⁵. Eine Möglichkeit zur Erfassung der $VO_2\text{max}$ ist der Spiroergometrie-Stufentest. Während des Spiroergometrie-Stufentests wird ein Individuum bis zur Erschöpfung belastet, in dem die Laufbandgeschwindigkeit stufenweise erhöht wird. Durch die gleichzeitige Messung der Sauerstoffaufnahme kann die maximale Sauerstoffaufnahme ($VO_2\text{max}$) des Individuums erfasst werden. Die $VO_2\text{max}$ charakterisiert sich dadurch, dass das Erreichen eines Plateaus in der Kurve der Sauerstoffaufnahme bei gleichzeitig erhöhter Geschwindigkeit vorliegt⁸⁶.

Es ist bekannt, dass durch Ausdauertraining die $VO_2\text{max}$ verbessert wird⁸⁷. Dadurch kann mehr Sauerstoff zur Muskelzelle transportiert und von dieser aufgenommen werden. Da die Sauerstoffversorgung für den aeroben Stoffwechsel einen limitierenden Faktor darstellt, bedeutet eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung durch die vermehrte Durchblutung auch eine bessere Versorgung des Muskels mit Energiesubstraten (Fettsäuren)⁸², wodurch sich eine erhöhte Ausdauerleistungsfähigkeit ergibt.

In dieser Arbeit wurden weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6N als Modelltier verwendet. Diese Mäuse können auf entsprechenden Trainingseinrichtungen, wie einem motorisierten Laufband, gut einer kontrollierten Ausdauertrainingsintervention unterzogen werden^{84,88-91}. Anhand des Laufbandes können Parameter wie Belastungsdauer und Belastungsintensität über die Geschwindigkeit des Laufbandes kontrolliert und genau vorgegeben werden. Ferner zeigen diese Mäuse die charakteristischen anatomisch-morphologischen und biochemischen Adaptationen in der Muskulatur an regelmäßiges Ausdauertraining^{92,93}. Die Wahl weiblicher Mäuse begründet sich darin, dass weibliche Mäuse in der von Seiten des Tierschutzes empfohlenen Gruppenhaltung weniger aggressives Verhalten zeigen als männliche Tiere und daher ein geringeres Verletzungsrisiko für die Tiere besteht. Darüber hinaus sind weibliche Mäuse für die vorliegende Fragestellung genauso gut geeignet wie männliche, da die weiblichen Mäuse die gleichen Anpassungen an Ausdauertraining (z.B. Geschwindigkeit, $VO_2\text{max}$) zeigen wie männliche Mäuse, wenn auch in etwas reduziertem Ausmaß⁸⁶.

In dieser Arbeit wurden zwei Diäten (NIA_{hoch} und $NIA_{\text{adä}}$) mit unterschiedlich hohen Niacinkonzentrationen eingesetzt. Die Diät mit der hohen Niacinkonzentration (NIA_{hoch}) wies mit 750 mg/kg Diät eine pharmakologische, d.h. über den Bedarf hinausgehende Niacinkonzentration auf. Als Orientierung für eine pharmakologische Niacinkonzentration diente eine Niacintagesdosis von 1 g, die häufig zur pharmakologischen Behandlung von Hypertriglyzeridämien beim Menschen mittels Niacin zum Einsatz kommt^{13,14}. Um diese Niacindosis beim Menschen mit derjenigen von Mäusen der NIA_{hoch} -Gruppe vergleichbar zu

machen, wurde die Dosis auf die metabolische Körpermasse ($=KM^{0,75}$) bezogen⁹⁷. Unter Berücksichtigung eines Futterverzehr von ca. 2,7 g NIA_{hoch}-Diät pro Maus und Tag und einem Körpergewicht von 20 g/Maus ergab sich damit eine Niacindosis von 38 mg/ $KM^{0,75}$. Für einen 70 kg schweren Menschen mit einer Tagesdosis von 1 g Niacin ergibt sich eine sehr ähnliche Dosis von 41 mg/ $KM^{0,75}$. Die Diät mit der niedrigeren bzw. bedarfsdeckenden Niacinkonzentration (NIA_{adä}) wies mit 30 mg/kg eine Niacinkonzentration auf, die den Empfehlungen des *American Institute of Nutrition* für die Versorgung von Labormäusen entsprach⁹⁴. Bei den angegebenen Niacinkonzentrationen beider Diäten handelt es sich jeweils um die Konzentration an supplementiertem Niacin. Die tatsächliche Konzentration an Niacin in den Diäten dürfte lediglich geringfügig höher liegen, da der native Niacingehalt der übrigen Diätkomponenten wie Maisstärke, Casein oder Sojaöl vernachlässigbar ist.

In dieser Arbeit werden drei Hypothesen untersucht:

- 1) Eine hohe Niacinsupplementierung verbessert die Ausdauerleistungsfähigkeit. Vermittelt wird dieser Effekt durch eine veränderte Muskelfaserzusammensetzung einhergehend mit einem veränderten Muskelphänotyp.
- 2) Das Ausmaß der Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit durch eine hohe Niacinsupplementierung ist mit der von regelmäßigem Ausdauertraining zu vergleichen.
- 3) Eine Kombination aus regelmäßigem Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung verbessert die Ausdauerleistungsfähigkeit stärker als es alleiniges regelmäßiges Ausdauertraining oder alleinige hohe Niacinsupplementierung hervorrufen kann.

Um diese drei Hypothesen zu testen, wurde ein 2-faktorielles Versuchsdesign durchgeführt, in dem die Faktoren hohe Niacinsupplementierung, Ausdauertraining und die Interaktion hohe Niacinsupplementierung und Ausdauertraining untersucht wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für den Versuch zur Untersuchung des Einflusses von einer hohen Niacinsupplementierung und/oder Ausdauertraining auf die Ausdauerleistungsfähigkeit wurden 40 weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6N (Jackson Laboratory, Bar Harbor ME, USA) verwendet. Die Tiere waren zu Beginn des Versuchs 10 Wochen alt.

Die Tiere wurden im Stoffwechsellabor des Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der JLU Gießen in Fünfergruppen in Makrolonkäfigen Typ III gehalten.

Die Tiere wurden in die folgenden vier Gruppen (Tabelle 3.1) eingeteilt:

Tabelle 3.1: Einteilung der Versuchstiere in verschiedene Behandlungsgruppen: NIA_{adä}=Gruppe mit adäquater Niacinsupplementierung, NIA_{adä} + AT=Gruppe mit adäquater Niacinsupplementierung und Ausdauertrainings, NIA_{hoch}=Gruppe mit hoher Niacinsupplementierung, NIA_{hoch} + AT= Gruppe mit hoher Niacinsupplementierung und Ausdauertraining.

| Abkürzung | n | Behandlung |
|--------------------------|----|---|
| NIA _{adä} | 10 | Diät mit bedarfsgerechter Niacinsupplementierung |
| NIA _{adä} + AT | 10 | Diät mit bedarfsgerechter Niacinsupplementierung und Ausdauertraining |
| NIA _{hoch} | 10 | Diät mit hoher Niacinsupplementierung |
| NIA _{hoch} + AT | 10 | Diät mit hoher Niacinsupplementierung und Ausdauertraining |

3.1.2 Futterzusammensetzungen und Fütterung

Die Mäuse erhielten eine semi-synthetische Diät, die den Empfehlungen *des American Institute of Nutrition* (AIN-93G) für wachsende Mäuse entsprach⁹⁴. Es wurde zwischen einer Diät mit bedarfsgerechter Niacinsupplementierung für die Gruppen NIA_{adä} und NIA_{adä} + AT und einer Diät mit einer hohen Niacinsupplementierung für die Gruppen NIA_{hoch} und NIA_{hoch} + AT unterschieden. Bei der Diät mit der hohen Niacin-supplementierung wurden der AIN-93G Diät zusätzlich 0,75 g Niacin/kg Diät zugefügt und der Cellulosegehalt um diese 0,75 g/kg Diät vermindert. Die Komponenten wurden gemischt (Diosna Universalmischer V 250) und anschließend pelletiert (Kahl Laborpresse Typ 14-175, Pelletdurchmesser 10 mm). Die Zusammensetzungen der Diäten, der Mineralstoffmischung und der Vitaminmischung sind in den Tabellen 3.2, 3.3 und 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Diäten nach Empfehlung des *American Institute of Nutrition*

| Komponenten | Menge [g/kg] |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Maisstärke | 532 |
| Casein (> 85% Protein) | 200 |
| Saccharose | 100 |
| Sojaöl | 70 |
| Cellulose | 50/49,25 ¹ |
| Mineralstoffmix (siehe Tabelle 3.3) | 35 |
| Vitaminmix (siehe Tabelle 3.4) | 10 |
| L-Cystein | 3 |
| Niacin | -/0,75 ¹ |

¹Veränderte Gehalte an Cellulose und Niacin in der Diät mit der hohen Niacinsupplementierung

Der Mineralstoffmix setzte sich wie in Tabelle 3.3 aus folgenden Mineralstoffen zusammen:

Tabelle 3.3: Mineralstoffmix AIN-93G-MX - Gehalt an Mineralien pro kg Diät (AIN-93G).

| Mineralstoff | Menge [mg/kg] |
|---------------------|----------------------|
| Calcium | 5000 |
| Kalium | 3600 |
| Chlorid | 1571 |
| Phosphor | 1561 |
| Natrium | 1019 |
| Magnesium | 507 |
| Schwefel | 300 |
| Eisen | 35,0 |
| Zink | 30,0 |
| Mangan | 10,0 |
| Kupfer | 6,0 |
| Silicium | 5,0 |
| Chrom | 1,0 |
| Fluorid | 1,0 |
| Nickel | 0,5 |
| Bor | 0,5 |
| Iod | 0,2 |
| Selen | 0,15 |
| Molybdän | 0,15 |
| Lithium | 0,1 |
| Vanadium | 0,1 |

Der Vitaminmix des Futtermittels setzte sich wie in Tabelle 3.4 angegeben zusammen:

Tabelle 3.4: Vitaminmix AIN-93G-VX - Gehalt an Vitaminen pro kg Diät (AIN-93G Futter).

| Vitamin | Menge |
|--------------------------------|--------------|
| Niacin [mg/kg] | 30,0 |
| Panθοthenat [mg/kg] | 15,0 |
| Pyridoxin [mg/kg] | 6,0 |
| Thiamin [mg/kg] | 5,0 |
| Riboflavin [mg/kg] | 6,0 |
| Folsäure [mg/kg] | 2,0 |
| Vitamin K [μg/kg] | 750 |
| D-Biotin [μg/kg] | 200 |
| Vitamin B12 [μg/kg] | 25 |
| Vitamin A [IU/kg] | 4000 |
| Vitamin D ₃ [IU/kg] | 1000 |
| Vitamin E [IU/kg] | 75 |

Den Mäusen wurde die jeweilige Diät während des gesamten Experiments *ad libitum* zu Verfügung gestellt. Das Wasser wurde den Mäusen über eine Nippeltränke zugänglich gemacht. Der Tierversuch wurde durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Alle experimentellen Vorgehensweisen folgten den etablierten Richtlinien in der Pflege und im Umgang mit Labortieren des Regierungspräsidiums Gießen. Weitere Details sind dem Tierversuchsantrag zu entnehmen (Aktenzeichen GI 16/2013).

3.2 Ergospirometrie und Ausdauertraining

Alle Mäuse wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn an das Training auf einem Laufband (*5 lanes treadmill for mice*, Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA, USA) gewöhnt. Hierbei absolvierten die Mäuse als Eingewöhnungsphase fünf Laufbandeinheiten in der Woche für je 10 min bei einer Geschwindigkeit von 0,05 m/sec.

Ergospirometrie

An Tag 1 der Versuchsperiode wurden alle Mäuse einem Stufentest mit Spirometrie auf dem Laufband (*single lane mouse treadmill with airtight option*, Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA, USA) zwecks Bestimmung der Ausdauerleistungsfähigkeit unterzogen. Das Laufband war während des Tests 25 ° geneigt. Zum Äquilibrieren wurden die Mäuse bei ruhendem Laufband für 3 min in die Kammer gesetzt (Abbildung 3.1). Die Anfangsgeschwindigkeit betrug 0,15 m/sec und wurde alle 3 min um 0,05 m/sec gesteigert (Tabelle 3.5).

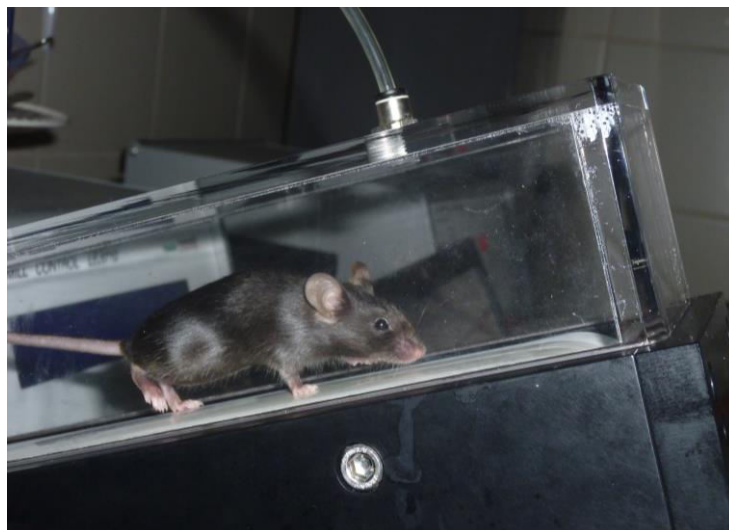


Abbildung 3.1: Maus in der Kammer des Laufbandes für die Ergospirometrie in der Äquilibrierungsphase

Tabelle 3.5: Ablauf der Ergospirometrie zur Bestimmung der Ausdauerleistungsfähigkeit bei Mäusen

| Stufe | Geschwindigkeit [m/sec] | Stufendauer [min] |
|-------|----------------------------|----------------------|
| 1 | 0,15 | 3 |
| 2 | 0,20 | 3 |
| 3 | 0,25 | 3 |
| 4 | 0,30 | 3 |
| 5 | 0,35 | 3 |

Der Leistungstest wurde abgebrochen, wenn eine Maus nicht mehr in der Lage war im oberen Bereich des Laufbandes zu laufen und sich mehr als zweimal zurück an die Bürste am Laufbandende fallen ließ. In diesem Falle war davon auszugehen, dass die Maus erschöpft und zum Abbruchzeitpunkt die Sauerstoffaufnahme maximal war (entspricht dem *Leveling off* = Punkt, an dem die Sauerstoffaufnahme trotz erhöhter Belastung nicht mehr ansteigt)⁹⁵. Die Auswertung erfolgte mit der Metabolism Software (Version 2.2.01, Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA, USA).

Dieser Ausdauerleistungstest wurde bei allen Tieren zu Beginn des Versuchs, nach drei Wochen Intervention (in der Versuchsmitte) und am Versuchsende nach sechs Wochen wiederholt (Tabelle 3.6).

Ausdauertraining

Die Gruppen, die das Ausdauertraining erhielten ($NIA_{\text{ada}} + \text{AT}$ und $NIA_{\text{hoch}} + \text{AT}$, $n = 20$), trainierten bei einer Intensität von 80 % ihres $VO_2\text{max}$ fünfmal pro Woche für je 35 min auf einem speziell motorisierten Laufband (s.o.) und einer Steigung von 12 %. Trainiert wurde in der Aktivitätsphase der Mäuse (Dunkelphase). Die Trainingsphase erstreckte sich über sechs Wochen (Abbildung 3.2).

| Versuchsbeginn | 1. Woche | 2. Woche | 3. Woche | Nach 3 Wochen | 4. Woche | 5. Woche | 6. Woche | Ende |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| ALV ^{a)} | AT ^{b)} | AT ^{b)} | AT ^{b)} | ALV ^{a)} | AT ^{b)} | AT ^{b)} | AT ^{b)} | ALV ^{a)} |

a) Messung des Ausdauerleistungsvermögens (ALV) bei allen 40 Tieren zu Versuchsbeginn, nach der dritten Woche und zu Versuchsende

b) Durchführung des Ausdauertrainings (AT) bei 20 (von 40) Tieren, welche die Intervention Ausdauertraining bekamen (NIA_{adä} + AT und NIA_{hoch} + AT): 5 d/Woche für je 35 min

Abbildung 3.2: Zeitstrahl der Testung des Ausdauerleistungsvermögens (ALV) und Durchführung des Ausdauertrainings (AT)

3.3 Gewinnung des Probenmaterials

Die Tötung der Mäuse erfolgte 44 Tage nach Beginn der Fütterung und zwei Tage nach dem Absolvieren der letzten Ergospirometriemessung. Überhangseffekte, die durch das Laufen auf dem Laufband während der Ergospirometrie entstehen, können durch den zweitägigen Zeitintervall zur letzten Belastung vermieden werden. Die Tiere wurden mittels CO₂- Einleitung (13 l/min) im Haltungskäfig narkotisiert⁹⁶, um den Stress für die Mäuse so gering wie möglich zu halten. Die ausreichende Betäubung zeigte sich am Fehlen jeglicher Körperspannung und dem Ausfall des Pupillarreflexes. Anschließend wurden sie durch Dekapitierung getötet.

Das Blut wurde umgehend nach der Tötung in Heparinröhrchen aufgefangen und bei 3.000 U/min für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um das Plasma abzutrennen. Nach der Überführung in drei Reaktionsgefäße wurde das Plasma zur späteren Analyse bei -20°C gelagert.

Des Weiteren wurden die Gewebe Muskel (*Musculus gastrocnemius* und *Musculus rectus femoris*) und Leber entnommen. Alle Leber- und Muskelproben wurden umgehend mit Hilfe von flüssigem Stickstoff tief gefroren. Bis zur späteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei -80°C.

3.4 Material

3.4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien mit Angaben des Herstellers angegeben (Tabelle 3.6, 3.7 und 3.8).

Tabelle 3.6: Verwendete Geräte mit Angaben des Herstellers

| Geräte | Hersteller |
|--|--|
| Adobe Photoshop, Version 9.0 | Adobe Systems Software, Dublin, Irland |
| API 3200 Triple-Quadrupol Massenspektrometer | Applied Biosystems/MDS SCIEX, Darmstadt, Deutschland |
| Axio Imager Fluoreszenzmikroskop | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| AxioCam HRm | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| AxioVision Software, Version 3.0.6 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| Cary®50 Bio- Spektralphotometer | Agilent Technologies, Santa Clara, USA |
| Doppelgelsystem, PerfectBlue™ Twin | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| Electrophoresis Power Supply | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| Eppendorf Research® plus | Eppendorf AG, Eppendorf Deutschland |
| Eppendorf Research® plus multichannel | Eppendorf AG, Eppendorf Deutschland |
| Fisher Scientific Mini Vortexer | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Gelsystem Midi S PerfectBlue™ | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| GeneFlash Geldokumentationssystem | Syngene, Cambridge, UK |
| Heparinröhrchen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge | Heraeus Holding GmbH, Osterode Deutschland |
| Heraeus™ Megafuge™ 1.0 | Heraeus Holding GmbH, Osterode Deutschland |

| Geräte | Hersteller |
|---|--|
| Heraeus™ Multifuge™ X1R | Heraeus Holding GmbH, Osterode |
| Heratherm™ Advanced Protocol Security Trockenschränke | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| InGenius | SynGene Genius, Synoptics Inc., USA |
| Kompaktschüttler KS-15 | Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland |
| Leica Biosystems CM1860 Kryostat | Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland |
| Magnetrührer IKA® RCT Classic | IKA-Werke, Staufen, Deutschland |
| Microplate Reader Infinite® M200 | Tecan, Crailsheim, Deutschland |
| Mikrozentrifuge GalaxyMiniStar | VWR, Darmstadt, Deutschland |
| Minitab, Version 13.0 | Minitab Inc., State College, PA, USA |
| Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell | Bio Rad, Hempstead, UK |
| Multipette® plus | Eppendorf AG, Eppendorf, Deutschland |
| NanoQuant Plate™ | Tecan, Crailsheim, Deutschland |
| PIPETBOY acu 2 | INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland |
| Plattformschüttler Duomax 1030 | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Primovert | Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland |
| Rotor-Gene® Q | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Schüttelwasserbad | JULABO Labortechnik, Seelbach, Deutschland |
| SE 245 Dual Gel Caster | Hofer, San Fransisco, USA |
| SE 250 Minivertical Unit | Hofer, San Fransisco, USA |
| Syngene G:BOX | SynGene Genius, Synoptics Inc., USA |

| Geräte | Hersteller |
|--|--|
| Syngene GeneTools Software | SynGene Genius, Synoptics Inc., USA |
| Thermocycler TProfessional Basic | Biometra, Göttingen, Deutschland |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Thermo Scientific™ 10 mm-Fläschchen mit Schraubgewinde | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| ThermoShaker TS1 | Biometra, Göttingen, Deutschland |
| Vortex-Schüttler REAX 2000 | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Western Trans-Blot System (Mini Trans-Blot® Cell) | Bio-Rad, München, Deutschland |
| Wippschüttler | Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland |

Tabelle 3.7: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Angaben des Herstellers

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---|---|
| Blotting-Papier Rotilabo® | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| CELLSTAR® Mikroplatten (96-Well Format) | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Circle Writer Liquid Blocker | Science Services GmbH, München, Deutschland |
| Fiber Pads | Bio-Rad, München, Deutschland |
| G:BOX Chemi Imaging System | Syngene, Cambridge, UK |
| Greiner Zentrifugenröhrchen | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Menzel Objektträger SuperFrost Plus Gold, geschliffen 90° | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Nitrozellulosemembran BioTrace™ NT | Pall, Dreieich, Deutschland |
| Nylonmembran | Roche, Mannheim, Deutschland |
| Parafilm 'M' laboratory film | Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA |
| Pasteurpipetten (ohne Wattestopfen) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| PCR-Tubes (0,1 ml) | LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland |

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|--|
| Peel-A-Way® Embedding Mold | Polysciences Europe GmbH, Hirschberg, Deutschland |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Pipettenspitzen | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml) | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Semi-micro Cuvette, 10x4x45 mm, Polystyrol | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Surgipath DB80 LS Premium | Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland |
| Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound | TISSUE TEC Sales & Service GmbH, Dormagen, Deutschland |

Tabelle 3.8: Verwendete Chemikalien mit Angaben des Herstellers

| Chemikalien | Hersteller |
|--|---|
| 5-fach Green GoTaq® Flexi Buffer | Promega, Madison, USA |
| 5-fach Puffer | Fermentas GmbH, Schwerte, Deutschland |
| 5x-Ladepuffer | Promega Cooperation, Mannheim, Deutschland |
| 100 bp DNA-Leiter | Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Acetat, konzentriert | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Acetonitril | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |
| Acetyl-Carnitin | LKT Laboratorien, St. Paul, USA |
| Acetyl-D3-L-Carnitin-HCl | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ammoniumperoxydisulfat (APS) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Bromphenolblau | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Butyrobetain (BB)-HCl | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Carnitin-Methyl-D3 Hcl | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Chloroform | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Deoxynucleotide (dNTPs; DNA Polymerisation Mix 10 nM pro dNTP) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

| Chemikalien | Hersteller |
|---|---|
| Diethylpyrocarbonat (DEPC; Verwendet als DEPC-H ₂ O) | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| <i>Enhanced chemiluminescence</i> (ECL) Lösung | GE Healthcare, München, Deutschland |
| Ethylendiamintetraazetat (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ethanol | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Formaldehyd (37 %) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Formamid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Formiat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain | Biotium, Hayward, CA, USA |
| GeneRuler™ 100 bp | Fermentas GmbH, Schwerte, Deutschland |
| Glycerol | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Glycin | Serra, Heidelberg, Deutschland |
| Isopropanol | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| KAPA™ SYBR® FAST QPCR | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| L-Carnitin | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Magermilchpulver | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol (HPLC-Grade) | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumacetat | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumdesoxycholat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumhydroxid | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Nikotinsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Nikotinamid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Nikotinursäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| <i>Normal goat serum</i> | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |

Material und Methoden

| Chemikalien | Hersteller |
|--|---|
| N-Morpholino-propansulfonsäure (Mops) | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Oligo-dT-Primer | Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland |
| Oxiracetam | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| peqGOLD Universal Agarose | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| <i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ponceau S Primer | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland |
| <i>Protease inhibitor cocktail</i> (PIC) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| RevertAid™ Reverse Transcriptase, 200 U/μl | Fermentas GmbH, Schwerte, Deutschland |
| Salzsäure (32 %) | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |
| <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Tetramethyldiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Trimethyllysin (TML)-HCL | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Triton™ X-100 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Trizol® Reagenz | Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Tween® 20 | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |

3.4.2 Verwendete Puffer und Lösungen und Reaktionssysteme (*Kits*)

Im Folgenden werden die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen und die Reaktionssysteme angegeben (Tabelle 3.9 und 3.10).

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung |
|---|--|
| Blockingpuffer, 5 %ig | 1 g Magermilchpulver 20 ml 1 x TBS-T |
| DEPC-H ₂ O | 0,1% DEPC in Reinstwasser → für 24 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, autoklaviert |
| Kaliumphosphat-Puffer | 500 ml mit pH 7 bestehend aus: KH ₂ PO ₄ (0,02 mol/l) K ₂ HPO ₄ (0,034 mol/l) EDTA (0,00015 mol/l) NaN ₃ (1,12 mol/l) |
| Ponceau S-Lösung | 0,5 % (w/v) Ponceau S 1 % (v/v) Acetat |
| <i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA)-Puffer | TRIS 50 mM NaCl 150 mM Glycerol 10 % SDS 0,1 % Triton™ X-100 1 % EDTA 1 mM Deoxycholat 0,5 % PIC 1 % |
| RNA-Gelladepuffer, 5x | 2 mg Bromphenolblau 8 µl 5 mM EDTA (pH 8) 72 µl Formaldehyd (37 %) 200 µl Glycerol 310 µl Formamid 400 µl Formaldehyd-Gelpuffer |

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung |
|--|---|
| RNA-Puffer (pH 7), 10 x | Mops 200 mM Natriumacetat 50 mM EDTA 10 mM → in sterilem DEPC-ddH ₂ O |
| Sammelgel | 300 µl Acrylamid 40% 750 µl Sammelgelpuffer mit 0,5 M TRIS, pH 6,8 1,9 ml ddH ₂ O 30 µl SDS 10 % 30 µl APS 4 µl TEMED |
| Sammelgelpuffer (pH 6,8) | 0,5 M TRIS → pH mit HCl einstellen |
| SDS-Laufpuffer (pH 8,3) | 25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS |
| Transferpuffer nach Towbin <i>et al.</i> (1979) ⁹⁸ (pH ~8,3) | 25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol → aufgefüllt auf 1 Liter mit ddH ₂ O |
| Trenngel, 12,5 %ig | 3,125 ml Acrylamid 40 % 2,5 ml Trenngelpuffer mit 1,5 M TRIS, pH 8,8 4,275 ml ddH ₂ O 100 µl SDS 10 % 100 µl APS 4 µl TEMED |
| Trenngelpuffer (pH 8,8) | 1,5 M TRIS → pH mit HCl einstellen |
| TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer, 1x | 40 ml 50 x TAE-Puffer mit 1960 ml Reinstwasser aufgefüllt |

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung |
|--|--|
| TAE-Puffer (pH 8,3), 50x | TRIS 2 M Acetat 1 M EDTA 50 mM → aufgefüllt auf 1 Liter mit Reinstwasser |
| <i>Tris-Buffered-Saline-Tween</i> (TBS-T) (pH 7,5), 5x | 15,14 g TRIS 21,915 g NaCl 2,5 ml Tween® 20 aufgefüllt auf 500 ml mit ddH ₂ O |

Tabelle 3.10: Verwendete Reaktionssysteme (*Kits*) mit Angaben des Herstellers

| Kits | Hersteller |
|---|---|
| <i>Bicinchoninsäure (BC) Assay protein Quantitation Kit</i> | Uptima-Interchim, Montlucon, Frankreich |
| ECL Plus Kit | GE Healthcare, München, Deutschland |
| Fluitest® GLU HK | Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland |
| Fluitest® TG | Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland |
| KAPA™ SYBR® FAST Universal | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| NEFA-HR(2) R1 Set | Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland |
| NEFA-HR(2) R2 Set | Wako Chemicals GmbH (Neuss, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland |
| Standardlösung aus dem Fluitest® GLU | Deutschland) Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland |
| NEFA Standard | Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland |

3.4.3 Verwendete Antikörper und Primer

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Primer mit Angaben des Herstellers angegeben (Tabelle 3.11, 3.12 3.13 und 3.14).

Tabelle 3.11: Primäre und sekundäre Antikörper zur Bestimmung der Muskelfaserverteilung

| Antikörper | Hersteller |
|-----------------------------------|---|
| 6H1 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA |
| Alexa Fluor 350 IgG _{2b} | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Alexa Fluor 488 IgG ₁ | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Alexa Fluor 555 IgM | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| BA-F8 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA |
| BF-F3 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA |
| SC-71 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA |

Tabelle 3.12: Verwendete Primer und deren Eigenschaften für RTD-PCR

| Gen | Primersequenz | Produkt- länge (bp) | T _m (°C) | NCBI GenBank |
|------------------------------------|---|---------------------------|------------------------|----------------|
| anerkanntes Symbol ¹ | - vorwärts, (3'-5') - - rückwärts, (5'-3') - | | | |
| <u>Referenz-</u> | | | | |
| <u>Gene</u> | | | | |
| ATP5B | GCCAGAGACTATGCGGCGCA CCCCCAAATGCTGGGCCACC | 187 | 64 | NM_016774.3 |
| B2m | CTCGGTGACCCTGGTCTTTC CATGCTTAACTCTGCAGGCG | 305 | 59 | NM_009735.3 |
| CANX | GTCCCCGGGAGGCTCGAGATAGAT ACCTCCCCTGTTGGAAGTGGAGC | 234 | 64 | NM_007597.3 |
| CYC1 | CGCAATGGAAGCTGCCGGGA CGCAATGGAAGCTGCCGGGA | 99 | 64 | NM_025567.2 |
| EIF4A2 | ACATGGCGGCCAGAGGGAA TGGTGGGGGCCAATACTAGTGCT | 299 | 64 | NM_001123038.2 |
| RPLP0 | CCTATAAAAGGCACACGCGG TGTGAGGCAGCAGTTTCTCC | 350 | 59 | NM_007475.5 |
| <u>Zielgene im Muskel</u> | | | | |
| CACT (<i>Slc25a20</i>) | TGGACACTGTTGCTGAGA TTGGCCAAAGGTATCGAG | 225 | 60 | NM_020520.4 |
| CD36 | GAGCAACTGGTGGATGGTTT GCAGAATCAAGGGAGAGCAC | 207 | 60 | NM_001159558.1 |
| COX4I1 | CTTCGAGCACATGGGAGTGT ATCAGAACGAGCGCAGTGAA | 296 | 57 | NM_009941.3 |
| COX6A2 | GCCATTCCTAGCCTCCCTTT TGCTGAGACATCAAGGGTGC | 328 | 60 | NM_009943.2 |
| CTP1b | ACTGAGACTGTGCGTTCCTG TGTAAGAGACCCCGTAGCC | 370 | 60 | NM_009948.2 |
| FATP (<i>Slc27a1</i>) | AAGGGCCAGGGATCTCTCTCTCCA TGTCGTCGCAGCTCTAGCCGA | 319 | 65 | XM_006509674.2 |
| GAPDH | CAACGACCCCTTCATTGAC AGACTCCACGACATACTCAG | 196 | 59 | NM_001289726.1 |
| GYS1 | AGGGGATGAATGGGGTGACA CATTCGTGGAAGTGGGCAAC | 384 | 60 | NM_030678.3 |

Material und Methoden

| Gen anerkanntes Symbol ¹ | Primersequenz - vorwärts, (3'-5') - - rückwärts, (5'-3') - | Produkt- länge (bp) | T_m (°C) | NCBI GenBank |
|--|---|-----------------------------------|------------------------------|---------------------|
| LCAD | CACAGGCCCTGGCTTCAGCC ATGCCATGGGCAGGCGATCG | 303 | 65 | NM_007381.4 |
| LDHA | CTTGCCGCTCTACTTGCTGT CTCATCCGCCAAGTCCTTCA | 334 | 60 | NM_001136069.2 |
| LPL | TGAGGATGGCAAGCAACACA TTGTTTGTCCAGTGTGAGCC | 384 | 57 | NM_008509.2 |
| MCAD | AGGTTTCAAGATCGCAATGG CTCCTTGGTGCTCCACTAGC | 152 | 58 | NM_007382.5 |
| MHCI (<i>Myh7</i>) | CTGGAGCTGGATGACGTCACCTC TGCTCCGGTGCTCATTGATCTGG | 109 | 64 | NM_080728.2 |
| MHCIIa (<i>Myh2</i>) | GGACGACTGCAGACCGAATCC AGCCTTAGACTCCTGCTCCTCC | 234 | 63 | NM_001039545.2 |
| MHCIIb (<i>Myh4</i>) | GAAACTGGAGGCTAGGGTGAGG TTGGCCAGGTTGACATTGGATTG | 246 | 61 | NM_010855.3 |
| MHCIIx (<i>Myh1</i>) | GGAAGCCCGCAATGCAGAAGAG TGTTTGCAGACCCTTGATAGC | 291 | 62 | NM_030679.1 |
| OCTN1 (<i>Slc22a4</i>) | GGTGGAAACATGCGGGACTA GAGCTGCTCAGGTTACAGT | 191 | 60 | NM_019687.3 |
| OCTN2 (<i>Slc22a5</i>) | GCACAGCCTTCTAACACCCT GACTCTCCAGGACAGATGCC | 150 | 58 | NM_011396.3 |
| PFKM | CCAGTGCATCTTAACCGACCAT TCGGGCACTTCCAATCACTG | 309 | 60 | NM_021514.4 |
| PHKA1 | TGAGTGGAGACGGGGTCTTT TCACGGTCAGCATTTTTGCG | 404 | 57 | NM_008832.2 |
| PPARGC1A | GACCCTCCTCACACCAAAC GCGACTGCGGTTGTGTATG | 91 | 59 | XM_006503779.2 |
| PPARGC1B | ATCTCTCTGACACGCAGGGT ATCCAGGGTCTTCGTAAGCG | 242 | 59 | NM_133249.2 |
| PPARD | GCGGACCTGGGGATTAATGG ATGGACTGCCTTTACCGTGG | 191 | 60 | NM_011145.3 |
| PYGM | CTCCAGGACATCATCCGACG TTCACTGTTACGTCCCAGGC | 200 | 60 | NM_011224.1 |
| SDHA | GCCCATCCCAGTCCCTCCCA TTGCTCCAAGCCGGTTGGCA | 170 | 61 | NM_023281.1 |
| VEGFA | CCTCGCAGTCCGAGCCGGA CGTGGGTGCAGCCTGGGAC | 150 | 65 | NM_001025257.3 |
| VEGFB | CGATGGCCTTGAATGTGTGC CTGTGTTCTTCCAGGGACATC | 109 | 60 | NM_001185164.1 |

Material und Methoden

| Gen anerkanntes Symbol ¹ | Primersequenz - vorwärts, (3'-5') - - rückwärts, (5'-3') - | Produkt- länge (bp) | T_m (°C) | NCBI GenBank |
|--|---|-----------------------------------|------------------------------|---------------------|
| <u>Zielgene in der Leber</u> | | | | |
| ACACA | ATGTGGCCTGGGTAGATCCT CGGACAAGGTAAGCCCAAT | 295 | 59 | NM_133360.2 |
| BBD | CCTAAAGGCAGAAGCAGTGC TCCGGTCAAATGTCAAATCA | 200 | 56 | XM_006498823.1 |
| CPT1A | CAAGGCTACAGTGGGACATT GAACTTGCCCATGTCCTTGT | 209 | 59 | NM_013495.2 |
| FASN | AGATGGAAGGCTGGGCTCTA GAAGCGTCTCGGGATCTCTG | 268 | 60 | NM_007988.3 |
| GAPDH | CAACGACCCCTTCATTGAC AGACTCCACGACATACTCAG | 196 | 60 | NM_001289726.1 |
| GYS2 | GCTGAGAGGGATCGGCTAAA CTGCATCAGGGTGTGGACTT | 162 | 60 | NM_145572.2 |
| GPAT | GCACATGGTTTGGGACTTGC GTGCCTTGTGTGCGTTTCAT | 333 | 56 | NM_008149.3 |
| LCAD | CACAGGCCCTGGCTTCAGCC CTCATCCGCCAAGTCCCTTCA | 303 | 65 | NM_007381.4 |
| LDHA | CTTGGCGCTCTACTTGCTGT ATGCCATGGGCAGGCGATCG | 334 | 60 | NM_001136069.2 |
| MCAD | AGGTTTCAAGATCGCAATGG CTCCTTGGTGCTCCACTAGC | 152 | 58 | NM_007382.5 |
| OCTN2 (<i>Slc22a5</i>) | GCACAGCCTTCTAACACCCT GACTCTCCAGGACAGATGCC | 150 | 58 | NM_011396.3 |
| PFKL | TCCGCACCTACAACATCCAC GGCTGGGATGACACACATGA | 128 | 60 | NM_008826.4 |
| PPARA | GTACTIONTAGGAAGCTGTCCGG CGTGAACTCCGTAGTGGTAC | 188 | 59 | NM_011144.6 |
| PYGL | TCCAGAGTGCTCTACCCCAA CATCAGCTCTGGAATGGCGA | 225 | 60 | NM_133198.2 |
| SDHA | GCCCATCCCAGTCCTCCCCA TTGCTCCAAGCCGGTTGGCA | 170 | 61 | NM_023281.1 |
| SREBP1C | ATCGGCGCGGAAGCTGTCTGGGGTAGCGTC ACTGTCTTGTGATGAGCTGGAGCAT | 112 | 64 | XM_006532716.1 |

Material und Methoden

¹Abkürzungen: ACACA=Acetyl-CoA Carboxylase Alpha, ATP5B= ATP Synthase, H⁺ Transporting, Mitochondrial F1 Complex, Beta Polypeptide, BBD= γ -Butyrobetain Dioxygenase, CACT=Carnitin-Acylcarnitin Carrier, CANX=Calnexin, CD36=fatty Acid Translocase, COX4I1=Cytochrome C Oxidase Subunit IV Isoform 1, COX6A2=Cytochrome C Oxidase Subunit Via Polypeptide 2, CPT1A=Carnitin Palmitoyltransferase 1A, CPT1b=Carnitin Palmitoyltransferase 1B, CYC1=Cytochrome C-1, EIF4A2=Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A2, FASN=Fatty Acid Synthase, FATP=Fatty Acid Transport Protein 1, GAPDH=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GPAT=Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase, GYS1=Glycogensynthase 1 (muskulär), GYS2=Glycogensynthase 2 (hepatisch), LCAD=Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, LDHA=Lactat-Dehydrogenase A, LPL=Lipoprotein Lipase, MCAD=Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, MHCI=Major Histocompatibility Complex I, MHCIIa=Major Histocompatibility Complex Iia, MHCIIb=Major Histocompatibility Complex Iib, MHCIIx=Major Histocompatibility Complex Iix, OCTN1=Novel organic cation transporter 1, OCTN2=Novel organic cation transporter 2, PFKL=Phosphofruktokinase (hepatisch), PFKM=Phosphofruktokinase (muskulär), PGC-1 α =Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α , PGC-1 β =Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 β , PHKA1=Phosphorylasekinase α 1 (muskulär), PPAR α =Peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR δ =Peroxisome proliferator-activated receptor delta, PYGL=Glycogenphosphorylase (hepatisch), PYGM=Glycogenphosphorylase (muskulär), RPL13A=Ribosomal Protein L13a, SDHA=Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A, SREPB1c=Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c, VEGFA=Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGFB=Vascular Endothelial Growth Factor B

Tabelle 3.13: Verwendete primäre Antikörper für den *Western Blot*

| | GAPDH | PGC-1α | Vinculin |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Klonalität | monoklonal | polyklonal | polyklonal |
| Spezies | Kaninchen | Kaninchen | Kaninchen |
| Molekulargewicht | 36 kDa | 100 kDa | 130 kDa |
| Verdünnung | 1:1000 | 1:1000 | 1:1000 |
| Antikörperansatz | 10 μ l AK, 10 ml TBS-T | 10 μ l AK, 10 ml 1x TBS-T | 25 μ l AK, 5 ml TBS-T |
| Hersteller | Abcam, Cambridge, UK | Millipore, Temecula, USA | Invitrogen, Camarillo, USA |

Tabelle 3.14: Verwendete sekundäre Antikörper für den *Western Blot*

| Sekundärer Antikörper | Hersteller | Verdünnung |
|---|--|-------------------|
| Anti-Kaninchen HRP-konjugierter AK | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland | 1:10000 |

3.5 Methoden

3.5.1 Bestimmung von Niacinparametern im Plasma

Die Konzentrationen an Nikotinsäure (NA), Nikotinamid (NAM) und Nikotinursäure (NUA) im Plasma wurden mittels LC-MS/MS nach der modifizierten Methode von Liu *et al.* (2012) bestimmt⁹⁹. Die verwendeten Standards Nikotinsäure, Nikotinamid, Nikotinursäure und Oxiracetam sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Die verwendeten Geräte zur Analyse sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Tabelle 3.15: Technische Daten zur Analyse der Konzentrationen von Niacin und Niacinmetaboliten mittels HPLC-MS/MS

| | |
|-------------------|--|
| Säule | M&N Nucleodur C18 Polartec, 3 µm 150 mm, ID 3mm (Nr. 713861) (Macherey & Nagel, Düren) |
| Vorsäule | EX 4/3 Nicleodur PolarTec, 3 µm (Nr. 761981.3), (Macherey & Nagel, Düren) |
| Fließmittel | Methanol/H ₂ O (10:90, v/v) 0,1% Ameisensäure |
| Fließrate | 0,35 ml/min |
| Temperatur | 35°C |
| Injektionsvolumen | 5 µl |
| Detektor | MS/MS Fa. ABSiex, Darmstadt, Deutschland MS/MS 3200 Qtrap |

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Applied Biosystems/MDS SCIEX, Version 1.5.1.

Probenaufbereitung

Die bei -20°C gelagerten Proben wurden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und bei 4000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Davon wurden 25 µl abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup gegeben. Hinzugegeben wurden je 10 µl eines internen Standards (Oxiracetam, 40 µg/ml in Methanol) und Methanol-Wasser (5:95 v/v). Anschließend wurde das Gemisch gevortext. Danach wurden 125 µl Acetonitril hinzupipettiert, nochmals für 1 Minute gevortext und bei RT zur besseren Proteinfällung 10 Minuten bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Ansatz bei 13000 g für 10 Minuten bei 5°C zentrifugiert. 125 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup gegeben und bis zum Trocknen bei 40°C unter Stickstoffatmosphäre eingedampft. Der Rückstand wurde gelöst in 75 µl Methanol-Wasser (10:90 v/v + 0,1 % Methansäure). Danach wurde das Gemisch bei 13000 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Ein Aliquot der Lösung wurde für die Niacin-Analytik in die LC-MS/MS injiziert. Die Gerätschaften für die HPLC-MS/MS sind in Tabelle 3.15 dargestellt. Ein API 3200 Triple-Quadrupol Massenspektrometer (ausgestattet mit einer Elektronenspray Ionisierung (ESI)) wurde für die Massenanalyse und die Detektion benutzt.

Die gesamte Laufzeit betrug 8 Minuten. Die Elution von NA, NAM, NUA und des internen Standard Oxiracetam (Tabelle 3.16) wurden nach 2,35, 3,39, 5,65 beziehungsweise nach 2,04 Minuten eluiert. Die Standardkurven waren in dem Bereich von 0,1 – 2,0 µg/ml für NA, von 0,25 – 5,0 µg/ml für NAM und 0,1 – 2,0 µg/ml für NUA mit einer durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0,999 für jeden Analyten linear. Die Präzision der Methode, festgestellt durch die dreimalige Wiederholung je einer Probe des Mäuseplasmas, lag bei 3,5 % für NAM. Kein Signal konnte für NA und NUA detektiert werden, da die Nachweisgrenze (NWG) unterschritten wurde (NWG < 0,05 µg/ml). Die Richtigkeit, erhalten durch Wiederfindungsexperimente, lag bei 111 %.

Die Massenspektrometrie erfolgte im positiven Ionen-Modus. Mit einem *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) wurden die Übergänge und die dazu korrelierenden Declustering-Potentiale (DP), Eingangspotential (EP), Zellkollisions-Eingangspotential (CEP), Kollisionsenergie (CE) und Zellkollisions-Ausgangspotential (CXP) gemessen (Tabelle 3.16). Weitere Parameter waren: Kollisionsgas, Vorhangsgas, Gas 1 und 2 (alle in Stickstoff) Medium; 25,60 und 60 psi; Verweilzeit 150 ms, Spannung des Ionensprays 5500 V, Temperatur 550 °C.

Tabelle 3.16: *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Übergänge und optimierte Verbindungsparameter für die Messung von Nikotinsäure (NA) und deren Metaboliten

| Verbindungsparameter: | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------|---|---------|--------|--------|---------|--------|---------|---|
| Substanz ¹ | m/z | | Tochter | DP (V) | EP (V) | CEP (V) | CE (V) | CXP (V) | |
| NA | 124,05 | → | 80,1 | 46 | 9 | 10 | 31 | 4 | |
| NA | 124,05 | → | 52,1 | 46 | 9 | 10 | 59 | 6 | |
| NAM | 123,00 | → | 80,0 | 41 | 7,5 | 10 | 27 | 4 | |
| NAM | 123,00 | → | 78,0 | 41 | 10 | 12 | 29 | 4 | |
| NUA | 181,11 | → | 135,2 | 41 | 7,5 | 12 | 23 | 4 | |
| NUA | 181,11 | → | 79,0 | 41 | 7,5 | 12 | 49 | 4 | |
| OXI | 159,08 | → | 114,0 | 21 | 8 | 10 | 19 | 4 | |
| OXI | 159,08 | → | 142,1 | 21 | 8 | 10 | 11 | 4 | |
| Gesamt: | | | | | | | | | 4 |

¹ NA=Nicotinsäure, NAM=Nicotinamid, NUA=Nicotinursäure, OXI=Oxiracetam (interner Standard), DP=Declustering-Potential, EP=Eingangspotential, CEP=Zellkollisions-Eingangspotential, CE=Kollisionsenergie, CXP=Zellkollisions-Ausgangspotential

Zur quantitativen Auswertung wurde jeweils die empfindlichste Tochtermasse (NA 124,1/80,1, NAM 123/80, NUA 181,1/135, OXI 159,1/114) herangezogen (Tabelle 3.16). Dagegen wurde die Richtigkeit der Analyten durch die Auswertung zweier Tochtermassen überprüft.

3.5.2 Bestimmung von Lipidparametern im Plasma

Zur Analyse der FFS-Konzentration im Plasma wurde das kommerzielle Testkit *NEFA-HR(2)* der Fa. Wako Chemicals GmbH genutzt und teilweise modifiziert nach den Vorgaben des Herstellers angewendet.

Probenaufbereitung und Messung der freien Fettsäuren (FFS)

Der Nachweis basiert auf der enzymatischen Umsetzung der FFS durch das Enzym Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure. In weiteren Schritten unter Einwirkung von Acyl-CoA-Oxidase und Peroxidase wird durch oxidative Bindung eine blau-violette Färbung erzeugt. Diese kann photometrisch erfasst werden¹⁰⁰. Die verwendeten Kits sind in Tabelle 3.10 zu finden.

Zu Beginn der Aufbereitung wurden die Reagenzien des Testkits gemäß den Angaben des Herstellers hergestellt. Folgende Modifikationen wurden vorgenommen: 25 µl unverdünntes Plasma wurden mit 250 µl des Testreagenz A und 500 µl des Testreagenz B vermischt und zweimal bei 37°C für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Extinktion bei 546 nm in einem Bio-Spektralphotometer gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Relation zum dazugehörigen FFS-Standard mit einer Konzentration von 1 mmol/l anhand der Vorgaben des Herstellers.

Probenaufbereitung und Messung der Triglyceride (TG)

Die Konzentration an Triglyceriden im Plasma wurde mit Hilfe eines enzymatischen Reagenz-Kits von Analyticon bestimmt (Tabelle 3.10). Dafür wurden 10 µl Plasma im Vortexer gemischt und unverdünnt mit 1000 µl Testsatzreagenz des Reagenz-Kits versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der Triglyceridgehalt photometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt und in Relation zu einem mitgeführten Standard (2,28 mmol/l) quantifiziert.

3.5.3 Bestimmung von Carnitinparametern im Plasma und in der Leber

Die Konzentrationen von Carnitin und dessen Vorstufen wurden mithilfe der HPLC kombiniert mit einem MS/MS nach einer modifizierten Methode von Hirche *et al.* (2009) gemessen¹⁰¹. Die verwendeten Standards und Chemikalien sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Die verwendeten Geräte zur Analyse sind in Tabelle 3.17 dargestellt.

Zum Ausgleich der Ionensuppression und Wiederfindungsverluste wurden als interne Standards die deuterierten Verbindungen von Carnitin (Carnitin-D3 25,41 $\mu\text{mol/l}$), Acetyl-Carnitin (Acetyl-Carnitin-D3 10,42 $\mu\text{mol/l}$) und γ -Butyrobetain (g-BB) (γ -Butyrobetain-D3 1,11 $\mu\text{mol/l}$) verwendet. Für Trimethyllysin (TML) wurde ebenso Carnitin D3 verwendet.

Tabelle 3.17: Technische Daten zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ - Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS

| | |
|--|--|
| Säule | Kromasil 100 Si; 5 μm , 125 mm x 2 mm (CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) |
| Vorsäule | Silica 4 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg) |
| Fließmittel | A=MeOH B=MeOH+H ₂ O+ACN+Essigsäure (100+90+9+1) lt.Hirche |
| Fließrate | 0,4 ml/min |
| Temperatur | 25°C |
| Injektionsvolumen | 3 μl |
| <u>HPLC-System</u> (Fa. Hitachi/VWR, Darmstadt, Deutschland) | |
| Pumpe | L-2160 U (LaChrom) binäres Pumpsystem |
| Säulenofen | L-6000 HPLC-Pumpe L-2300 Säulenthermostat |
| Autosampler | L-2200U (LaChrom) |
| Detektor | MS-System MS/MS 3200 Qtrap |

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Analyst 1.5.1.

Probenaufbereitung

Die Plasmaproben wurden aufgetaut und bei 5000 g für 3 min bei RT zentrifugiert. Je 20 µl Plasma wurden mit 200 µl Methanol/internem Standardmix versetzt, gewhirlt und für 5 Minuten zur besseren Ausfällung der Proteine auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 20000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und 75 µl des Überstandes für die Analyse im Autosampler in Mikrovials überführt.

Die Leberproben (ca. 50 mg) wurden gefriergetrocknet. Anschließend wurden sie mit 500 µl Methanol/H₂O-Gemisch (1+2) versetzt und im TissueLyser für 4 Minuten bei 30 Hz homogenisiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten im Ultraschallwasserbad und im Anschluss eine Inkubation im Thermoschüttler für 30 Minuten bei 50°C und 650 U/min. Anschließend wurden die Proben auf RT abgekühlt. Bei 10°C und 21000 g wurden die Proben dann zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C zwischengelagert. Zum Weiterverarbeiten wurden die Proben aufgetaut, je 20 µl des Überstandes mit 200 µl Methanol und 20 µl des internen Standards versetzt, gewhirlt und bei RT für 10 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 21000 g und 15°C für 10 Minuten mit anschließendem Überführen des Überstandes (75 µl) in Mikrovials des Autosamplers für die MS-HPLC-Messung.

Kalibrierung

Die Kalibrationsstandards, bestehend aus L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ-Butyrobetain, wurden entsprechend der Proben ebenfalls mit internem Standardmix versehen und aufgearbeitet. Die abgedeckten Kalibrationsbereiche zeigt Tabelle 3.18:

Tabelle 3.16: Kalibrationsbereiche zur Analyse der Konzentrationen an L-Carnitin, Acetyl-Carnitin, Trimethyllysin und γ-Butyrobetain mittels HPLC-MS/MS

| | |
|-----------------|-----------------|
| L-Carnitin | 2,03 – 101,3 µM |
| Acetyl-Carnitin | 0,99 – 49,7 µM |
| Trimethyllysin | 0,11 – 5,6 µM |
| γ-Butyrobetain | 0,09 – 4,4 µM |

Die Konzentrationen wurden mittels interner Standard-Korrektur und linearer Regression anhand deren Peakflächen unter Einbeziehung der Einwaagen berechnet.

Tabelle 3.19: Analytierte Massen der Mutter-/Tochterionen und Stoffparameter für die MS/MS-Detektion von Carnitin, Acetylcarnitin und deren deuterierten Metaboliten

| Verbindungsparameter | | | | | | | |
|----------------------|----------|---------|--------|--------|---------|--------|---------|
| Substanz | m/z | Tochter | DP (V) | EP (V) | CEP (V) | CE (V) | CXP (V) |
| Carnitin103 | 162,11 → | 103,00 | 36 | 8 | 10 | 21 | 4 |
| Carnitin85 | 162,11 → | 85,00 | 36 | 8,5 | 10 | 27 | 4 |
| Carnitin-D3 | 165,16 → | 103,20 | 36 | 8 | 14 | 23 | 4 |
| Ac-Carn85 | 204,13 → | 85,00 | 31 | 7 | 15 | 25 | 4 |
| Ac-Carn145 | 204,13 → | 145,10 | 31 | 7 | 12 | 17 | 4 |
| Ac-Carn60 | 204,13 → | 60,10 | 31 | 7 | 12 | 25 | 4 |
| Ac-Carn-D3 | 207,16 → | 85,00 | 31 | 7 | 15 | 25 | 4 |
| g-BB | 146,09 → | 87,00 | 31 | 6,5 | 13 | 21 | 4 |
| g-BB-D3 | 149,13 → | 87,20 | 31 | 7,5 | 13 | 21 | 4 |
| TML/HoArg189/84 | 189,15 → | 84,10 | 31 | 6,5 | 12 | 27 | 4 |
| Gesamt | | | | | | | 4 |

Die internen Standards der korrespondierenden nativen Substanzen waren Carnitin-D3, Acetyl-Carnitin-D3 und γ -Butyrobetain-D3.

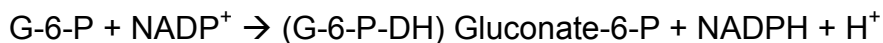
Abkürzungen: Ac-Carn=Acetyl-Carnitin, DP=Declustering-Potential, EP=Eingangs-potential, CEP=Zellkollisions-Eingangspotential, CE=Kollisionsenergie, CXP=Zellkollisions-Ausgangspotential

Zur quantitativen Auswertung wurde jeweils die empfindlichste Tochtermasse (Carnitin103 162,11/103, Ac-Carn85 204,14/85, g-BB 146,09/87 und TML/HoArg189/84 189,15/84,1) herangezogen (Tabelle 3.19). Dagegen wurde die Richtigkeit der Analyten durch die Betrachtung des Verhältnisses der zwei empfindlichsten Tochtermassen, welches gleich war, sichergestellt. Mit Wiederfindungsexperimenten wurde die Richtigkeit der Analyten gemessen. Sie lag bei Carnitin bei 101 %, für Acetyl-Carnitin bei 101,4 %, für g-BB bei 93,3 % und für TML bei 112 %. Die Präzision lag für alle vier Analyten bei 4-7 %.

3.5.4 Bestimmung des Glycogengehalts in der Muskulatur und der Leber

Das in den Muskeln vorhandene Glycogen wurde mittels Säurekochen zu Glucose abgebaut und extrahiert^{102,103}. Die Bestimmung der Glucose im Extrakt erfolgte mit Hilfe des Testkits „Fluitest GLU HK“ von Analyticon®. Anhand der ermittelten Glucosekonzentration wurde im Anschluss auf den Glycogengehalt umgerechnet. Der im Muskel vorhandene native Glucose- und Glucose-6-Phosphat-Anteil wurde vernachlässigt, da deren Anteil im Muskel nur sehr gering ist. Die zur Analyse benötigten Reagenzien dazu sind in Tabelle 3.20 dargestellt.

Um die Glucosekonzentration im Extrakt zu bestimmen, liefen zwei enzymatische Reaktionen ab. Zuerst wurde mit der Hexokinase die Glucose mithilfe von ATP phosphoryliert. Anschließend wurde das gebildete Glucose-6-Phosphat (G-6-P) durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit Hilfe von NADP⁺ zu Gluconate-6-Phosphat oxidiert. Das NADP⁺ wird in dieser Reaktion reduziert.



Das gebildete NADPH wurde photometrisch bei 340 nm erfasst. Die Messung der Menge an NADPH erlaubt eine genaue Bestimmung der Menge der von der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase umgesetzten Glucose, die NADPH-Molmenge ist exakt proportional zur Glucose-Molmenge.

Probengewinnung

In ein 2 ml Eppendorf-Cup wurden 20–30 mg Muskel eingewogen. Nach Zusatz von 1 ml 2N HCl wurden die Proben für 2 h bei knapp 100°C gekocht. Nach dem Säureaufschluss wurden die Proben gewirbelt und auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Proben mit ca. 0,5–0,6 ml 4N NaOH auf einen pH zwischen 5,5 und 7,5 eingestellt. Die neutralisierten Proben wurden nach der pH-Einstellung für 10 Minuten bei 3500 U und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der gesamte Überstand in ein neues 2 ml Eppendorf-Cup überführt. Vor der Analyse wurde die Probe bei 3500 U für 3 min zentrifugiert. Der Standard wurde 1:1 mit

ddH₂O verdünnt. Die Proben und der Standard wurden dem Pipettierschema gemäß (Tabelle 3.20) mit dem Arbeitsreagenz und ddH₂O aufbereitet. Anschließend wurden die Lösungen für 3 Sekunden mit einem Rührspatel vermischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde am Photometer die Extinktion bei 340 nm mithilfe des mit dem GLU-HK (Tabelle 3.10) gemessen..

Tabelle 3.20: Pipettierschema zur Bestimmung der Glyogenkonzentration in Halbmikroküvetten

| Komponente | Blindwert | Probe | Standard |
|--------------------|-----------|--------|----------|
| Probe | - | 50 µl | - |
| Standard | - | - | 50 µl |
| ddH ₂ O | 50µl | - | - |
| Arbeitsreagenz | 500 µl | 500 µl | 500 µl |

Berechnung des Glycogengehaltes

Der Umrechnungsfaktor von Glucose in Glycogen beträgt 0,9, da im Glycogenverband das Glucosemolekül um ein Wassermolekül vermindert ist¹⁰⁴.

$$\text{Glycogen } (\mu\text{mol/g}) = \text{Glucose } (\mu\text{mol/g}) \times 0,9$$

3.5.5 Bestimmung der Muskelfaserverteilung

Die Bestimmung der Muskelfaserverteilung wurde anhand einer Immunfluoreszenzmethode modifiziert nach Bloemberg *et al.* (2012) vorgenommen¹⁰⁵. Die bei -80°C gelagerten Muskelproben wurden dazu in Tissue-Tek eingebettet und bei -20°C gelagert. Anschließend wurden 10 µm dicke Schnitte an einem Kryotom hergestellt. Zum Anfärben wurden die Schnitte luftgetrocknet. Anschließend wurde der erste Antikörper-Cocktail (Tabelle 3.21) auf die Schnitte gegeben. Sowohl der primäre, als auch der sekundäre Antikörpercocktail enthielten 10 % *normal goat serum*.

Tabelle 3.21: Verdünnung und MHC Reaktivität des primären und sekundären Antikörpercocktails zur Bestimmung der Muskelfaserverteilung bei der Maus

| primärer Antikörpercocktail und Konzentrationen | MHC Reaktivität | sekundärer Antikörpercocktail und Konzentrationen |
|---|-----------------|---|
| BA-F8 (1:50) ¹ | I | Alexa Fluor 350 IgG _{2b} 1:500 (blau) ¹ |
| SC-71 (1:600) ¹ | IIa | Alexa Fluor 488 IgG ₁ 1:500 (grün) ¹ |
| BF-F3 (1:100) ¹ | IIb | Alexa Fluor 555 IgM 1:500 (rot) ¹ |
| SC-71 (1:600) ² | IIa | Alexa Fluor 488 IgG ₁ 1:500 (grün) ² |
| 6H1 (1:50) ² | IIx | Alexa Fluor 555 IgM 1:500 (rot) ² |
| Normal goat serum ^{1/2} | | Normal goat serum ^{1/2} |

¹ primärer/sekundärer Antikörpercocktail 1

² primärer/sekundärer Antikörpercocktail 2

Da nicht alle vier Muskelfasertypen anhand der Immunfluoreszenzmethode auf einer Probe dargestellt werden können, wurden je 2 Schnitte der gleichen Probe verwendet. Auf den ersten Schnitt wurde der primäre Antikörpercocktail 1 gegeben, auf den anderen der primäre Antikörpercocktail 2. Diese wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 1x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit Triton™ X-100 für je 5 Minuten. Anschließend wurden die sekundären Antikörpercocktails 1 bzw. 2 auf die Schnitte gegeben und für 1 h inkubiert. Danach erfolgte nochmals dreimaliges Waschen mit 1x PBS mit Triton™ X-100 für je 5 Minuten. Danach wurden *mount coverslips* auf die Schnitte gelegt. Für die Darstellung der verschiedenen Muskelfasern durch Immunfluoreszenz wurden die Schnitte visualisiert mit einem Fluoreszenzmikroskop, das ausgestattet ist mit Filtern für Rot (Excitation: BP 545/25 nm; Emission: BP 605/70 nm), Grün (Excitation: BP 470/40 nm; Emission: BP 525/50 nm), Blau (Excitation: 365/12 nm; Emission LP 397 nm), einer

AxioCam HRm Kamera und der AxioVision Software. Individuelle Bilder wurden von jedem Querschnitt gemacht und als übereinander gelegte Bilder mit Adobe Photoshop bearbeitet. Für die Bestimmung der Muskelfaserzusammensetzung wurden alle Fasern innerhalb eines bestimmten Abschnittes des Querschnittes gezählt.

3.5.6 Genexpressionsanalysen in der Leber und in der Muskulatur

3.5.6.1 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels Trizol® nach Angaben des Herstellers. Einwegmaterialien wurden zuvor autoklaviert, um eine möglichst RNase freie Umgebung zu gewährleisten. Das verwendete Wasser wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. DEPC kann kovalent an primäre und sekundäre Amine im katalytischen Zentrum vieler RNAsen binden und sie auf diesem Weg inaktivieren.

Die tiefgefrorenen Leber- sowie Muskelproben (je 15-20 mg Leber, je 25-30 mg Muskulatur) wurden jeweils mit 1 ml Trizol® lysiert und 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe kleiner Metallkugeln erfolgte die Homogenisierung der Gewebe im Tissue Lyser. Die Leberproben wurden für 4 Minuten bei 15 Hz und die Muskelproben zweimal für 4 Minuten bei 15 Hz homogenisiert. Zur Phasenseparation wurden die Proben mit 200 µl Chloroform versetzt, kurz gemischt, 3 Minuten bei RT inkubiert und bei 13000 U/min und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert.

Für die RNA-Präzipitation wurde die obere, wässrige, RNA-enhaltende Phase in ein steriles Eppendorf-Tube überführt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde kurz gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Um ein Pellet zu erhalten, wurde anschließend für 10 Minuten bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte eine erneute kurze Zentrifugation bei 3000 U/min und die Abnahme des restlichen Überstands mithilfe einer Pipette. Zum Reinigen des Pellets wurde 1000 µl Ethanol (75 %) zugegeben, gevortext und 5 Minuten bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und es wurde kurz bei 3000 U/min zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde sauber abgenommen und die Pellets wurden unter der sterilen Werkbank für 30-60 Minuten getrocknet. Die aus den Leber- und Muskelproben gewonnenen Pellets wurden anschließend mit 50 µl

DEPC-Wasser versetzt. Die Resuspension erfolgte im Thermoschüttler für 10 Minuten bei 68 U/min und 60°C. Die gelöste RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

Weitergehend erfolgte die Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm mittels Mikroplatten-Reader. Der Quotient aus beiden Extinktionen gilt als Reinheitsmaß der RNA und gibt Hinweise darauf, ob die Präparation mit Protein, genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) und/oder aromatischen Substanzen kontaminiert ist. Die Konzentration wurde mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.5.6.2 komplementäre DNA (cDNA)-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus den Leber- und den Muskelproben wurden jeweils 1,2 µg gelöste RNA mit DEPC-Wasser auf 7,5 µl aufgefüllt und mit 17,5 µl Mastermix versetzt (siehe Tabelle 3.22).

Tabelle 3.22: Zusammensetzung des Mastermixes für einen Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese

| Reagenz | Volumen (µl) |
|-----------------------|---------------------|
| DEPC H ₂ O | 9,95 |
| 5x Puffer | 5 |
| dNTP Mix | 1,25 |
| Oligo-dT-Primer | 1 |
| Reverse Transkriptase | 0,3 |

Das Umschreiben von messenger RNA (mRNA) in cDNA geschah mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase im Thermocycler. Die enzymatische Reaktion erfolgte innerhalb einer Stunde bei 42°C. Danach wurde das Enzym über einen Zeitraum von 10 Minuten durch Erhöhung der Temperatur auf 70°C inaktiviert. Es folgte eine Abkühlungsphase bei 4°C. Nach Beendigung der cDNA-Synthese wurden die Proben mit 50 µl DEPC-H₂O verdünnt. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.5.6.3 Realtime-detection-Polymerase-Kettenreaktion (RTD-PCR)

Für den RTD-PCR Ansatz wurden jeweils 2 µl cDNA mit 18 µl Mastermix versetzt. Bei der *non-template-control* (NTC) wurde statt der cDNA 2 µl DEPC-H₂O verwendet. Die genspezifischen Primer (Tabelle 3.12) wurden mit dem Programm Primer3 designt und von Eurofins MWG Operon bezogen. Die RTD-PCR wurde mittels Rotor-Gene Q durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Proben bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung des *cycle threshold* (ct)-Wertes wurde die Analysesoftware von Rotor-Gene Q genutzt. Die Amplifikationseffizienz wurde bei allen Proben auf 2 festgelegt. Die relative mRNA-Konzentration wurde mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode bestimmt, mittels derer die relative Veränderung der Genexpression ermittelt werden kann¹⁰⁶.

Es wurden fünf Referenzgene (ATP5B, CANC, CYC1, EIF4A2 und RPLP0) gemessen. Mithilfe der drei stabilsten Referenzgene wurde der Normalisierungsfaktor mittels *GeNorm Primerdesign Analysis* errechnet, welcher genutzt wurde, um individuelle Schwankungen in der Genexpression auszugleichen. Bei der Analyse der Leberproben wurden ATP5B, CYC1 und EIF4A2, beim *M. gastrocnemius* wurden ATP5B, CANX und CYC1 und beim *M. rectus femoris* wurden ATP5B, CANX und CYC1 als Referenzgene für die Ermittlung des Normalisierungsfaktors genutzt. Die Referenzgene sind in Tabelle 3.12 dargestellt. Die normalisierten Genexpressionen der jeweiligen Gruppe wurden relativ zur Gruppe NIA_{ada} dargestellt. Diese Gruppe wurde dabei auf 1,0 gesetzt.

3.5.6.4 Agarose Gelelektrophorese

Um die Spezifität des Primers und damit nachfolgend die Richtigkeit des entstandenen PCR-Produktes zu kontrollieren, wurden diese stichprobenartig mithilfe eines 1,2 %igen Agarosegels bei 100 V und 140 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 2,25 g Agarose zusammen mit 150 ml des 1x TAE-Puffers (Tabelle 3.9) kurz zum Sieden gebracht. Nach Abkühlung auf 70°C wurden 3 µl GelRed™ zugesetzt, kurz geschwenkt und das Gel in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels (ca. 30 Minuten bei RT) wurden der Kamm und die Seitenteile des Gelschlittens vorsichtig entfernt und das Gel auf seinem Gelschlitten in eine Gelkammer mit 1x TAE-Puffer gelegt. Dort erfolgte zunächst eine Equilibrierungsphase von 10 Minuten bevor anschließend die Proben aufgetragen wurden. Die Proben (20 µl) wurden mit jeweils 5 µl 5x-Ladepuffer versetzt. Davon wurden jeweils 7 µl in die Geltaschen pipettiert.

Zusätzlich wurde eine 100 bp DNA-Leiter als Marker (4 µl) mitgeführt, um die Produktgrößen bestimmen zu können. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Das GelRed™ interkaliert zwischen benachbarten Basen der Nukleinsäure. Durch Fluoreszenz kann die DNA in Form von Banden unter UV-Licht visualisierbar gemacht werden. Die Detektion und Auswertung erfolgte mithilfe des Dokumentationssystems SynGene.

3.5.7 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

3.5.7.1 Proteinisolierung aus der Muskulatur

Mittels *Radio-Immuno-Precipitation-Assay-Buffer* (RIPA-Puffer, Tabelle 3.9) wurden die Gewebeproben der Muskulatur der Mäuse homogenisiert. Der RIPA-Puffer dient dabei zur Extraktion von Proteinen. Zur Herstellung des Puffers wurden die in Tabelle 3.10 aufgelisteten Substanzen verwendet.

Je 45-55 mg Muskulatur wurden in 500 µl RIPA-Puffer mit Protease Inhibitor Cocktail (PIC) nach Zugabe kleiner Metallkugeln im Tissue Lyser homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 60 Minuten auf Eis gelegt und danach bei 14,2 U/min und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der das fertige Proteinlysate enthielt, wurde in neue Tubes überführt und bei -20°C weggefroren.

3.5.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt mithilfe der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode. Diese basiert auf dem Prinzip der Kolorimetrie. Peptidbindungen der Proteine reduzieren hierbei Cu^{2+} zu Cu^+ . Die einfach positiv geladenen Kupferionen reagieren anschließend in einer weiteren Reaktion mit BCA, wodurch ein stabiler und wasserlöslicher violetter Komplex entsteht. Dieser Farbkomplex lässt sich bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch nachweisen. Die Absorption ist dabei proportional zur Proteinkonzentration, wodurch deren Berechnung im Vergleich zu einer Standardreihe möglich ist. Hierfür wurde ein BCA-Kit mit BSA als Standard verwendet. Die Standardreihe mit acht Standards von 0 µg Protein/ml (Leerwert) bis 1 mg Protein/ml wurde durch Verdünnung der BSA-Stammlösung (2 mg/ml) mit unterschiedlichen Anteilen Wasser hergestellt und konnte bei -20°C bis zur weiteren

Verwendung eingefroren werden. Um sicherzustellen, dass die Proteinkonzentration der untersuchten Proben im Bereich der Standardkurve lag, wurde zudem eine Probenverdünnungsreihe in den Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:50, 1:70 und 1:100 zusammengestellt. Das zur Messung benötigte Reagenzgemisch wurde in einem Verhältnis von 50:1 aus Reagenz A und B hergestellt. Zur Messung wurden je 25 µl der verschiedenen Standards, 25 µl Kontrolle (Leerwert) sowie 25 µl jeder Probe in je eine Kavität einer 96-Well-Mikroplatte pipettiert. Diese wurde nach Zugabe von 200 µl Reagenzgemisch pro Kavität für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT konnte die Absorption bei 562 nm gegen die Kontrolle (Wasser und Reagenzgemisch) im Mikroplatten-Reader gemessen werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der gemessenen BSA-Standardkurve, die die Eichgerade darstellte. Die Werte der optimalen Verdünnung lagen dabei nahe dem mittleren Standard.

3.5.8 SDS-PAGE und Western Blot

Veränderungen auf mRNA-Ebene gehen nicht automatisch mit einer veränderten Expression von Proteinen einher. Daher ist es von Bedeutung, auch die Menge des exprimierten Proteins zu quantifizieren. Eine Möglichkeit zum Nachweis von Proteinen stellt der Western Blot dar, bei dem Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von einem Trenngel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden können. Dabei wird eine Kopie des Gels produziert, die mit Antikörpern zur quantitativen und qualitativen Bestimmung einzelner Proteine behandelt werden kann. Bei der indirekten Nachweismethode wird ein primärer Antikörper durch einen markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. In dem Niacin-Ausdauer-Mausversuch wurden die Proteine GAPDH und PGC-1 α , sowie das Referenzprotein Vinculin, welches durch die verschiedenen Interventionen nicht beeinflusst wurde, in der Muskulatur mittels Western Blot untersucht.

3.5.8.1 Vorbereitung der Proben

Von jeder Probe wurden 50 µg Protein in einem Volumen von 15 µl eingesetzt. Für den Nachweis der Proteine wurden die 15 µl der Probe mit je 5 µl Ladepuffer Roti®-Load1 versetzt. Dieser diente als Blaumarker und kann den Abbau der Proteine während der Erhitzung verhindern. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer denaturiert und dann in die Taschen des Gels pipettiert.

3.5.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Anhand der SDS-PAGE wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel getrennt. Dieses bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Für die hier zu detektierenden Proteine wurde eine Acrylamidkonzentration von 12,5 % im Sammelgel verwendet. Für die Herstellung von zwei 12,5 %igen Trenngelen (Tabelle 3.9) wurden die in Tabelle 3.8 aufgeführten Substanzen gemischt.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz. Dieses denaturiert die Proteine und überdeckt deren Eigenladung, sodass die Proteine gleichmäßig negativ geladen sind. Durch diese gleichmäßig negative Ladung wandern die Proteine im elektrischen Feld ausschließlich in Abhängigkeit ihrer molekularen Größe. Die Trenngele wurden in die Apparatur SE 245 Dual Gel Caster gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach 20 Minuten war das Gel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Zum Gießen von zwei Sammelgelen (Tabelle 3.9) wurden die in Tabelle 3.8 aufgeführten Substanzen verwendet.

Die Sammelgele wurden auf die Trenngele gegossen, mit Kämmen zur Ausbildung von Geltaschen versehen und 20 Minuten in derselben Apparatur polymerisiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der SDS-Hoefer SE 250 *mini-vertical gel electrophoresis unit*. Diese wurde nach Anleitung des Herstellers aufgebaut. Der Laufpuffer (Tabelle 3.9) wurde in den Tank der Apparatur gegossen. Nach Entnahme der Kämmen wurden je 20 µl jeder Probe in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Als Marker zum Abschätzen der aufgetrennten Proteingrößen wurde der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* eingesetzt. Strom wurde angelegt und die Elektrophorese startete mit einer Spannung von 100 V sowie einer Stromstärke von 12 mA. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 200 V und die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die Elektrophorese endete, als die Marker der gesuchten Molekulargewichte die Mitte des Gels erreichten.

3.5.8.3 Western Blot

Im darauf folgenden Schritt wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dieser Vorgang wird als „Blotting“ bezeichnet. Dazu wurden die Gele von der Glasplatte getrennt und in dem Transferpuffer (=Blotpuffer, Tabelle 3.9) für 10 Minuten inkubiert.

Zum Blotten wurde nach Anleitung der Apparatur Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell aus Filterpapieren, Nitrocellulosemembranen und dem Gel ein Blot-Sandwich gebaut und in die Apparatur eingespannt. Der eingebaute Eisblock sorgte dabei für Kühlung des Transferpuffers, der mit einem Magnetrührer gemischt wurde. Bei einer Stromstärke von 300 mA und einer Spannung von 100 V wurden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen. Nach 90 Minuten wurde der Blotvorgang gestoppt. Die Membran mit den nun darauf fixierten Proteinbanden wurde mit Ponceau S (Tabelle 3.9) angefärbt, 2 Minuten inkubiert und anschließend mit ddH₂O gespült. Danach wurde die Membran im Bio-Imaging System fotografiert und mit der Syngene GeneTools Software ausgewertet. Durch die Färbung mit Ponceau S lässt sich erkennen, ob gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden. Mit 1 x *Tris-Buffered-Saline-Tween* (TBS-T) wurde die Membran entfärbt. 1 x TBS-T wurde durch Verdünnung von 5 x TBS-T hergestellt, welcher aus den in Tabelle 3.9 aufgeführten Komponenten besteht.

Nach Abschluss des Blottingverfahrens wurden die Membranen für 1 Stunde in 5 % Blockierpuffer auf einer Schwenkplatte inkubiert. Der 5 % Blockierpuffer setzte sich aus den in Tabelle 3,10 aufgeführten Komponenten zusammen.

3.5.8.4 Antikörperbehandlung

Nachdem Blocken wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten mit 1 x TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran zur Markierung der Proteine über Nacht bei 4°C auf einer Rocking Plattform mit einer primären Antikörperlösung inkubiert. Diese bestand aus 10 ml 1 x TBS-T und dem primären spezifischen Antikörper in vorgegebener Konzentration (Tabelle 3.13). Nachdem die Membranen zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper drei mal 10 Minuten mit 1 x TBS-T gewaschen wurden, konnten sie mit sekundären Antikörpern behandelt werden. Die

Antikörperlösung der sekundären Antikörper bestand aus 10 ml 1 x TBS-T, sowie dem jeweiligen Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 3.14). Bei den sekundären Antikörpern musste auf Klonalität und abstammende Spezies der primären Antikörper geachtet werden. Die Membran wurde für 90 Minuten bei RT mit dem sekundären Antikörper auf dem Schwenker inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit 1 x TBS-T für je 10 Minuten konnte die Membran entwickelt werden.

3.5.8.5 Entwicklung mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*)

Zum Entwickeln wurde die *enhanced chemiluminescence* (ECL) Lösung eingesetzt. Nach Anleitung des Herstellers wurden im Verhältnis 1:1 Reagenz A und Reagenz B gemischt und die Membranen damit je 5 Minuten bei RT überschichtet. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit dem Bio-Imagine System SynGene. Mit der SynGene GeneTools Software konnte die Intensität der Banden ausgewertet und damit die relative Proteinmenge quantifiziert werden.

3.5.9 Statistische Auswertung

Die Behandlungseffekte wurden mittels allgemeinem linearem Modell (*general linear model*) (Faktoren: Ausdauertraining, Niacin, sowie Niacin x Ausdauertraining) mithilfe des Statistikprogramms Minitab analysiert. Ausreißer wurden definiert, wenn sie außerhalb der Spanne Mittelwert \pm 2fache Standardabweichung lagen und anhand dessen anschließend eliminiert. Als post-hoc Test wurde der Bonferroni-Holm-Test angewandt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p \leq 0,05$) wurde als Signifikanzgrenze festgelegt. Bei $p < 0,15$ wurden die Unterschiede als tendenziell signifikant bezeichnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede sind mit Buchstaben (^{a,b,c}) gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Gewichtsentwicklung und Futtermittelaufnahme

Um den Einfluss von Ausdauertraining, Niacinsupplementierung und der Kombination aus Ausdauertraining und Niacinsupplementierung bei Mäusen zu untersuchen, wurden unter anderem die Futtermittelaufnahme und die Gewichtsentwicklung zwischen den Gruppen beobachtet.

Während des sechswöchigen Versuchszeitraumes betrug die mittlere Futtermittelaufnahme pro Maus und Tag 2,66 g. Die Futtermittelaufnahmen pro Maus und Tag unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Die Mäuse waren zu Versuchsbeginn zehn Wochen alt und damit ausgewachsen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Mäuse ein mittleres Gewicht von 18,9 g und unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Zu Versuchsende konnten keine Unterschiede im Gewicht zwischen den Gruppen festgestellt werden, jedoch hatte die hohe Niacinsupplementierung einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung, sodass die Mäuse in den Gruppen NIA_{hoch} und NIA_{hoch} + AT eine verminderte Gewichtsentwicklung aufwiesen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Entwicklung der Futtermittelaufnahmen und des Gewichtes bei Mäusen während der 6-wöchigen Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|----------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| Futtermittelaufnahme (g/d) | 2,66 ± 0,02 | 2,74 ± 0,01 | 2,54 ± 0,06 | 2,69 ± 0,11 | 0,060 | 0,129 | 0,494 |
| Anfangsgewicht (g) | 18,5 ± 1,9 | 19,0 ± 1,1 | 19,1 ± 0,7 | 19,2 ± 0,7 | 0,396 | 0,283 | 0,675 |
| Endkörpergewicht (g) | 22,4 ± 1,4 | 22,3 ± 1,8 | 21,7 ± 1,2 | 22,3 ± 1,5 | 0,568 | 0,434 | 0,447 |
| Gewichtsentwicklung (g) | 3,96 ± 1,51 | 3,37 ± 1,53 | 2,64 ± 1,01 | 3,10 ± 1,05 | 0,865 | 0,044 | 0,176 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

4.2 Entwicklung der Ausdauerleistungsfähigkeit

Um die Entwicklung der Ausdauerleistungsfähigkeit zu messen, wurde eine Ergospirometrie durchgeführt. Die Parameter gelaufene Distanz (m), $VO_2\text{max}$ ($\text{ml}/\text{min}/\text{kg}^{0,75}$), Geschwindigkeit bei Ausbelastung (cm/s) und gelaufene Dauer (sec) wurden dabei untersucht.

Zu Versuchsbeginn konnte bei keinem der Parameter Distanz, $VO_2\text{max}$, Geschwindigkeit oder gelaufene Dauer ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 4.2).

Nach drei Wochen hatte das Ausdauertraining bei allen vier gemessenen Parametern Distanz, $VO_2\text{max}$, Geschwindigkeit und gelaufene Dauer einen signifikant positiven Einfluss. Für den Parameter Geschwindigkeit lag eine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung vor, sodass hier zu erkennen war, dass Ausdauertraining bei hoher Niacinsupplementierung stärker die Geschwindigkeit verbessert als bei adäquater Niacinsupplementierung. Die alleinige hohe Niacinbehandlung hatte hingegen keinen Einfluss (Tabelle 4.2).

Ebenso konnte nach einem sechswöchigen Versuchszeitraum eine signifikante Verbesserung der gemessenen Parameter durch das Ausdauertraining beobachtet werden. Die Parameter Distanz, Geschwindigkeit und Dauer waren weiterhin durch die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung verbessert, für den Parameter $VO_2\text{max}$ konnte immerhin die Tendenz ($p < 0,15$) eines Einflusses durch die Interaktion nachgewiesen werden. Bei hoher Niacinsupplementierung hatte das Ausdauertraining also einen sehr viel stärkeren Effekt auf die Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit als das Ausdauertraining bei adäquater Niacinsupplementierung. Die alleinige hohe Niacinbehandlung hatte, wie auch schon nach drei Wochen, hingegen keinen Einfluss, mit Ausnahme des Parameters Distanz ($p=0,013$) (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Parameter der Ergospirometrie (Distanz, VO₂max, Geschwindigkeit und Dauer) bei Mäusen während der 6-wöchigen Versuchsperiode

| | NIA _{ada} | NIA _{ada} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| | | | | | AT | NIA | ATxNIA |
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | | | |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| zu Versuchsbeginn | | | | | | | |
| Distanz (m) | 156 ± 23 | 135 ± 40 | 153 ± 38 | 159 ± 44 | 0,503 | 0,405 | 0,279 |
| VO ₂ max (ml/min/kg ^{0,75}) | 73,3 ± 4,2 | 71,7 ± 4,4 | 72,4 ± 3,6 | 72,1 ± 3,0 | 0,475 | 0,862 | 0,590 |
| Geschwindigkeit (cm/s) | 32,5 ± 2,6 | 30,5 ± 4,4 | 32,0 ± 3,5 | 32,0 ± 2,6 | 0,352 | 0,640 | 0,352 |
| Dauer (sec) | 699 ± 71 | 622 ± 137 | 685 ± 124 | 700 ± 136 | 0,443 | 0,425 | 0,257 |
| nach 3 Wochen | | | | | | | |
| Distanz (m) | 144 ± 41 | 172 ± 41 | 138 ± 42 | 204 ± 24 | 0,001 | 0,324 | 0,141 |
| VO ₂ max (ml/min/kg ^{0,75}) | 70,6 ± 2,5 | 75,6 ± 4,7 | 70,2 ± 3,6 | 73,4 ± 4,0 | 0,003 | 0,320 | 0,480 |
| Geschwindigkeit (cm/s) | 32,2 ± 3,6 ^{ab} | 33,9 ± 4,2 ^{ab} | 29,5 ± 4,4 ^b | 36,0 ± 2,1 ^a | 0,002 | 0,799 | 0,050 |
| Dauer (sec) | 653 ± 138 | 744 ± 123 | 631 ± 146 | 834 ± 73 | 0,001 | 0,407 | 0,173 |
| nach 6 Wochen | | | | | | | |
| Distanz (m) | 147 ± 32 ^b | 180 ± 46 ^b | 142 ± 55 ^b | 273 ± 62 ^a | 0,001 | 0,013 | 0,007 |
| VO ₂ max (ml/min/kg ^{0,75}) | 72,7 ± 4,3 | 75,8 ± 4,1 | 71,6 ± 3,2 | 79,7 ± 4,6 | 0,001 | 0,335 | 0,079 |
| Geschwindigkeit (cm/s) | 32,2 ± 2,6 ^b | 36,0 ± 6,6 ^{ab} | 31,7 ± 5,0 ^b | 42,0 ± 4,2 ^a | 0,001 | 0,094 | 0,046 |
| Dauer (sec) | 664 ± 102 ^b | 765 ± 138 ^b | 641 ± 185 ^b | 953 ± 63 ^a | 0,001 | 0,079 | 0,026 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch ^{a,b,c} gekennzeichnet.

4.3 Biochemische Parameter im Plasma

4.3.1 Niacinstatus

Im Rahmen des Versuchs wurden die Konzentrationen des NAM, der NA und der NUA im Plasma der Mäuse bestimmt. Die Konzentrationen an NA und NUA waren im Plasma jedoch unterhalb der Nachweisgrenzen von $< 0,1 \mu\text{g/ml}$ und konnten damit nicht ermittelt werden.

Durch die hohe Niacinsupplementierung konnte die NAM-Konzentration im Plasma der Gruppen mit der hohen Niacinsupplementierung signifikant gesteigert werden (Tabelle 4.3).

4.3.2 Carnitinstatus

Die gemessenen Konzentrationen des Gesamtcarnitins, des freien Carnitins und des Acetylcarnitins zeigten zwischen den Gruppen keine Unterschiede. Die Parameter γ -Butyrobetain und Trimethyllysin stellen Vorstufen des Carnitins dar. Auch hier konnten in keinem der beiden Parameter Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 4.4).

4.3.3 Freie Fettsäuren und Triacylglyceride

Um die lipidsenkenden Eigenschaften des Niacins zu untersuchen, wurden im Weiteren die Plasmakonzentrationen der FFS und der TAG bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen dieser Lipidparameter zwischen den Gruppen.

Tabelle 4.3: Nikotinamid-Konzentration im Plasma der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| (µg/ml) | | | | | | | |
| Nikotinamid | 0,96 ± 0,27 ^b | 0,62 ± 0,13 ^b | 5,69 ± 1,57 ^a | 6,51 ± 1,29 ^a | 0,476 | 0,001 | 0,093 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.
Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch ^{a,b,c} gekennzeichnet.

Tabelle 4.4: Konzentrationen an Carnitinparametern (Gesamtcarnitin, L-Carntin, Acetyl-Carnitin und die Carnitinvorstufen γ-Butyrobetain und Trimethyllysin) im Plasma der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| (µmol/l) | | | | | | | |
| Gesamtcarnitin | 29,1 ± 3,60 | 31,2 ± 6,01 | 28,7 ± 4,80 | 28,1 ± 5,20 | 0,659 | 0,339 | 0,440 |
| freies Carnitin | 21,1 ± 2,30 | 21,2 ± 3,40 | 20,1 ± 3,20 | 21,1 ± 3,90 | 0,657 | 0,638 | 0,700 |
| Acetyl-Carnitin | 7,95 ± 1,89 | 10,0 ± 5,40 | 8,34 ± 2,90 | 7,05 ± 1,59 | 0,734 | 0,276 | 0,158 |
| γ-Butyrobetain | 0,31 ± 0,08 | 0,37 ± 0,09 | 0,32 ± 0,08 | 0,31 ± 0,07 | 0,437 | 0,300 | 0,269 |
| Trimethyllysin | 2,26 ± 0,69 | 2,13 ± 0,79 | 1,74 ± 0,40 | 1,87 ± 0,38 | 0,947 | 0,078 | 0,581 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

Tabelle 4.5: Konzentrationen an freien Fettsäuren und Triacylglyceriden im Plasma der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| (mmol/l) | | | | | | | |
| FFS | 0,54 ± 0,02 | 0,62 ± 0,20 | 0,56 ± 0,21 | 0,49 ± 0,18 | 0,951 | 0,455 | 0,283 |
| TG | 0,98 ± 0,17 | 0,93 ± 0,23 | 0,92 ± 0,22 | 0,98 ± 0,22 | 0,918 | 0,995 | 0,489 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

4.4 Biochemische Parameter in der Leber und der Muskulatur

4.4.1 Carnitin

Die Varianzanalyse zeigte in der Leber einen signifikanten Einfluss der hohen Niacinsupplementierung auf die Parameter Gesamtcarnitin und freies Carnitin und erhöhte diese. Weiterhin hatte dieser Haupteffekt einen tendenziell steigernden ($p < 0,15$) Einfluss auf die Konzentration von Acetyl-Carnitin. Das Ausdauertraining hatte keinen Effekt auf die Carnitinparameter und es gab auch keine Interaktion zwischen den Haupteffekten.

Die Konzentrationen der Carnitinvorstufen γ -Butyrobetain und Trimethyllysin wurden weder durch das Ausdauertraining, noch durch die hohe Niacinsupplementierung beeinflusst und es gab auch keine Interaktion der Haupteffekte (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Konzentration an Carnitinparametern (Gesamtcarnitin, L-Carntin, Acetyl-Carnitin und die Carnitinvorstufen γ -Betyrobetain und Trimethyllysin) in der Leber der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| (nmol/g Frischmasse) | | | | | | | |
| Gesamtcarnitin | 261 ± 47 | 262 ± 68 | 310 ± 43 | 298 ± 60 | 0,757 | 0,019 | 0,717 |
| freies Carnitin | 238 ± 47 | 239 ± 62 | 282 ± 36 | 270 ± 53 | 0,739 | 0,022 | 0,712 |
| Acetyl-Carnitin | 22,8 ± 6,7 | 23,2 ± 10,6 | 28,2 ± 10,8 | 27,5 ± 10,7 | 0,969 | 0,127 | 0,878 |
| γ -Butyrobetain | 1,98 ± 0,60 | 2,04 ± 0,94 | 2,61 ± 0,14 | 2,04 ± 0,45 | 0,874 | 0,650 | 0,639 |
| Trimethyllysin | 10,7 ± 2,0 | 11,2 ± 5,1 | 11,4 ± 2,5 | 9,6 ± 2,3 | 0,543 | 0,641 | 0,278 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

4.4.2 Leberglycogen und Muskelglycogen

In der Leber hatten weder das Ausdauertraining, noch die hohe Niacinsupplementierung einen signifikanten Einfluss auf die Glycogenkonzentrationen und es gab auch eine Interaktion zwischen den Haupteffekten Ausdauertraining und hohe Niacinsupplementierung.

Auch im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* war kein Einfluss von Ausdauertraining oder hoher Niacinsupplementierung nachzuweisen, ebenso lag keine Interaktion zwischen den Haupteffekten vor (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Glycogenkonzentration in der Leber und der Muskulatur der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| µmol/g | | | | | | | |
| Leber | 139 ± 52 | 176 ± 56 | 185 ± 67 | 185 ± 46 | 0,333 | 0,162 | 0,332 |
| <i>M. gastrocnemius</i> | 6,04 ± 1,62 | 6,44 ± 3,00 | 6,34 ± 2,05 | 7,27 ± 1,92 | 0,387 | 0,463 | 0,734 |
| <i>M. rectus femoris</i> | 4,60 ± 1,06 | 4,89 ± 1,22 | 5,04 ± 1,23 | 5,18 ± 1,47 | 0,618 | 0,420 | 0,842 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

4.5 Muskelfaserzusammensetzung

Um den Einfluss des Ausdauertrainings, der Niacinsupplementierung und der Kombination aus beidem auf den Muskelfasertyp zu untersuchen, wurde auf histologischer Basis mittels einer Immunofluoreszenztechnik die Muskelfaserzusammensetzung im jeweiligen Muskel bestimmt.

4.5.1 Verteilung der Muskelfasertypen im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Im *M. gastrocnemius* konnte beobachtet werden, dass durch die hohe Niacinsupplementierung der Anteil der MHCIIa-Fasern signifikant erhöht war, während der Anteil der MHCIIb-Fasern signifikant vermindert war (Abbildung 4.1 A) und B), Tabelle 4.8). Ebenso hatte die hohe Niacinsupplementierung tendenziell ($p < 0,15$) einen Einfluss, der in einem erhöhten Anteil der MHCI-Fasern resultierte. Ein Einfluss auf den Anteil der MHCIIx-Fasern war nicht nachzuweisen (Tabelle 4.8).

Ausdauertraining hatte keinen Effekt auf die Muskelfaserzusammensetzung und eine Interaktion zwischen den Haupteffekten konnte auch nicht nachgewiesen werden (Tabelle 4.8).

Im *M. rectus femoris* hatten weder Ausdauertraining, noch die Niacinsupplementierung einen signifikanten Einfluss auf die Muskelfaserzusammensetzung und es gab auch keine Interaktion zwischen den Haupteffekten. Ausnahme war der Einfluss der hohen Niacinsupplementierung auf den MHCIIx-Faseranteil, der erhöht wurde (Abbildung 4.2 A) und B), Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Prozentuale Zusammensetzung der Muskelfasern im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| | | | | | AT | NIA | ATxNIA |
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | | | |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| <i>M. gastrocnemius</i> | | | | | | | |
| MHCI | 4,54 ± 5,73 | 6,64 ± 6,60 | 8,75 ± 6,16 | 9,46 ± 7,37 | 0,300 | 0,055 | 0,907 |
| MHCIIa | 31,5 ± 16,7 | 37,1 ± 11,6 | 41,0 ± 15,0 | 60,8 ± 17,1 | 0,107 | 0,017 | 0,659 |
| MHCIIx | 15,4 ± 6,3 | 14,6 ± 7,8 | 14,8 ± 3,4 | 12,8 ± 5,8 | 0,749 | 0,839 | 0,918 |
| MHCIIb | 48,5 ± 25,8 | 41,8 ± 20,8 | 35,4 ± 21,6 | 16,9 ± 23,8 | 0,200 | 0,035 | 0,726 |
| <i>M. rectus femoris</i> | | | | | | | |
| MHCI | 0,28 ± 0,61 | 0,37 ± 0,74 | 0,74 ± 1,81 | 1,24 ± 1,72 | 0,524 | 0,155 | 0,661 |
| MHCIIa | 22,6 ± 12,9 | 21,0 ± 14,0 | 18,7 ± 10,8 | 26,6 ± 15,8 | 0,489 | 0,851 | 0,299 |
| MHCIIx | 14,5 ± 6,9 | 21,5 ± 9,6 | 22,9 ± 6,0 | 25,7 ± 8,0 | 0,065 | 0,020 | 0,420 |
| MHCIIb | 62,6 ± 13,0 | 57,2 ± 19,5 | 57,7 ± 15,5 | 46,5 ± 22,9 | 0,179 | 0,209 | 0,635 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

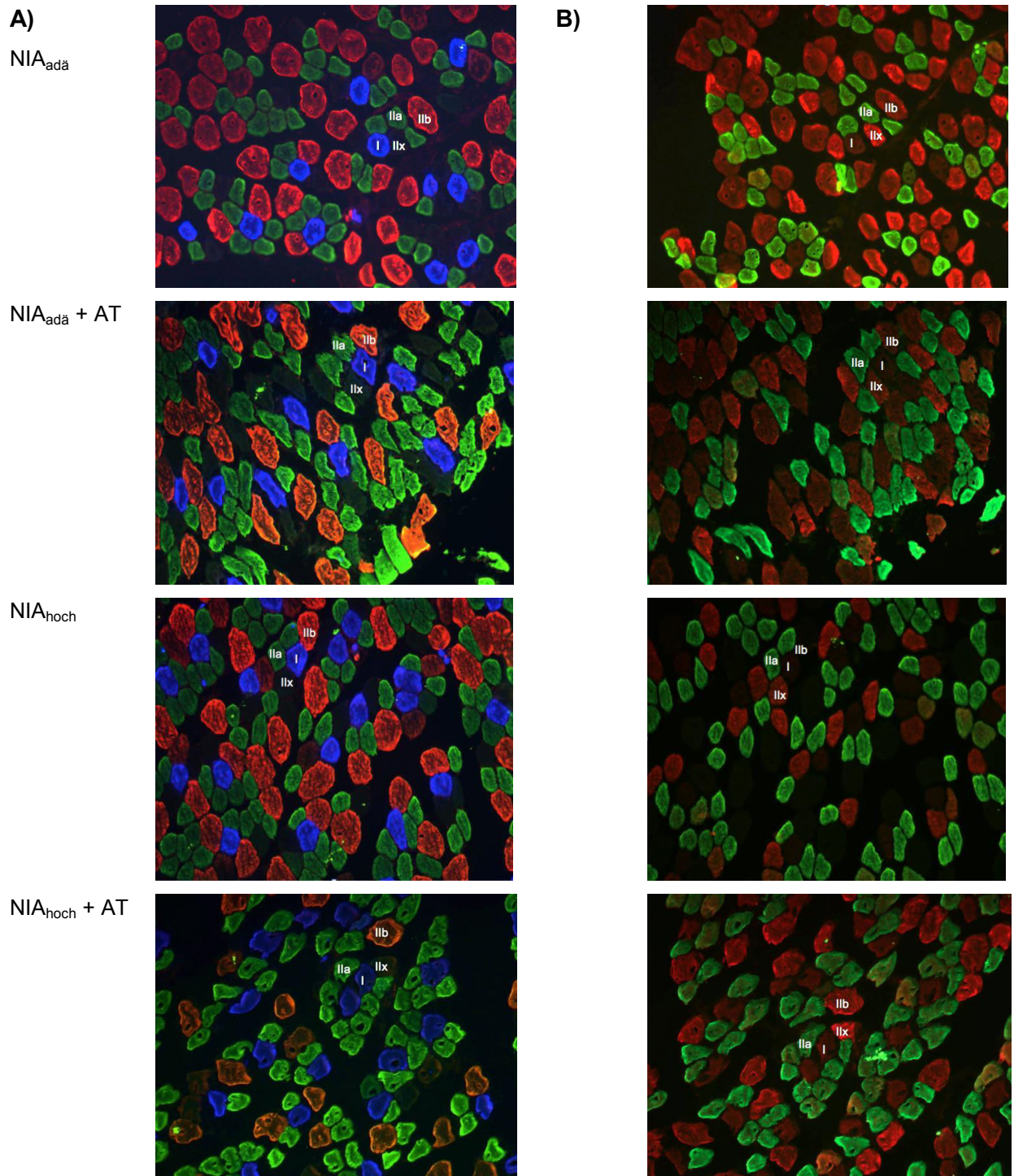


Abbildung 4.1: Repräsentative Bilder von Querschnitten des *M. gastrocnemius* der Mäuse zur Differenzierung der Muskelfasertypen anhand der MHC-Isoformen nach 6-wöchiger Versuchsperiode. A) Gezeigt sind Muskelquerschnitte, die mit einem primären Antikörpercocktail gegen MHC I (BA-F8), MHCIIa (SC-71) und MHCIIb (BF-F3) inkubiert wurden, gefolgt durch die Inkubation der dazugehörigen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörper. Sichtbar sind Typ I (blau), Typ IIa (grün) und Typ IIb (rot) und Typ IIx (nicht gefärbt). B) Gezeigt sind Muskelquerschnitte, die mit einem primären Antikörpercocktail gegen MHCIIa (SC-71) und MHCIIx (6H1) inkubiert wurden, gefolgt von einer Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörper. Diese zweite Färbung B) bestätigt das Vorhandensein der Typ IIa Fasern (grün) und zeigt, dass die ungefärbten Fasern aus A) Typ IIx (rot) vorhanden sind.

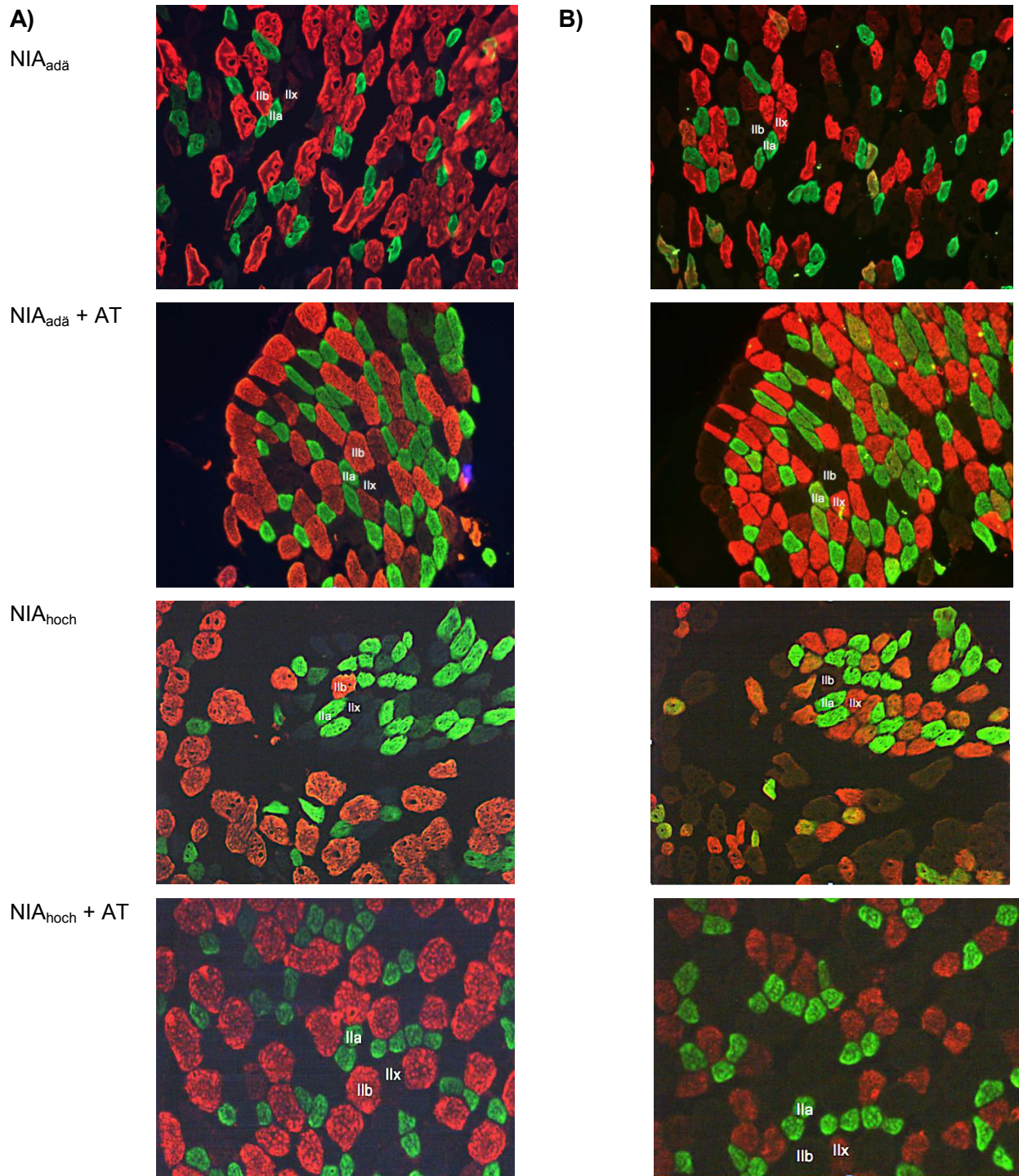


Abbildung 4.2: Repräsentative Bilder von Querschnitten des *M. rectus femoris* der Mäuse zur Differenzierung der Muskelfasertypen anhand der MHC-Isoformen nach 6-wöchiger Versuchsperiode. A) Gezeigt sind Muskelquerschnitte, die mit einem primären Antikörpercocktail gegen MHC I (BA-F8), MHCIIa (SC-71) und MHCIIb (BF-F3) inkubiert wurden, gefolgt durch die Inkubation der dazugehörigen mit einem Fluoreszenz-farbstoff-markierten sekundären Antikörper. Sichtbar sind Typ I (blau), Typ IIa (grün) und Typ IIb (rot) und Typ IIx (nicht gefärbt). B) Gezeigt sind Muskelquerschnitte, die mit einem primären Antikörpercocktail gegen MHCIIa (SC-71) und MHCIIx (6H1) inkubiert wurden, gefolgt von einer Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörper. Diese zweite Färbung B) bestätigt das Vorhandensein der Typ IIa Fasern (grün) und zeigt, dass die ungefärbten Fasern aus A) Typ IIx (rot) vorhanden sind.

4.5.2 Expression von *Myosin Heavy Chain*-Isoformen im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Um auf molekularer Basis die teilweise durch die Intervention veränderte Muskelfaserzusammensetzung zu untersuchen, wurden die mRNA-Konzentrationen von MYH7 codierend für MHC I, MYH2 codierend für MHC IIA, MYH4 codierend für MHC IIB und MYH1 codierend für MHC 2X analysiert.

Im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* konnte beobachtet werden, dass weder das Ausdauertraining, noch die hohe Niacinsupplementierung einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen der Gene der MHC-Isoformen hatte. Auch gab es keine Interaktion zwischen dem Ausdauertraining und der hohen Niacinsupplementierung (Tabelle 4.9).

4.6 Expression von Genen des kontraktile und metabolischen Muskelfaserphänotyps im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Um im Weiteren den zu Grunde liegenden Mechanismus der Muskelfasertransformation im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* näher zu untersuchen, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen der Hauptregulatoren der Muskelfaserzusammensetzung (PPARD codierend für den Peroxisome proliferator-activated receptor δ , PPARGC1A codierend für den Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α und PPARGC1B codierend für den Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 β) ermittelt.

4.6.1 mRNA-Konzentrationen von Genen der molekularen Regulatoren der Muskelfasertransformation im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Im *M. gastrocnemius* hatten weder das Ausdauertraining, noch die hohe Niacin-supplementierung einen Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen von PPARD, PPARGC1A und PPARGC1B, ebenso war keine Interaktion zwischen den Haupteffekten nachzuweisen (Tabelle 4.10).

Im *M. rectus femoris* war ein signifikanter Einfluss der hohen Niacinsupplementierung auf die mRNA-Konzentration des PPARD zu erkennen, wodurch diese erhöht war. Die mRNA-Konzentration des PPARGC1A zeigte eine durch Ausdauertraining vermittelte Steigerung. Eine Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf die mRNA-Konzentrationen von PPARGC1A, PPARGC1B und PPARD war nicht nachweisbar (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.9: Relative mRNA-Konzentrationen der MHC-Isoformen im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{ada} | NIA _{ada} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| <i>M. gastrocnemius</i> | | | | | | | |
| <i>MHC1</i> | 1,00 ± 0,92 | 1,56 ± 1,67 | 1,37 ± 1,01 | 1,35 ± 1,74 | 0,833 | 0,905 | 0,269 |
| <i>MHC2A</i> | 1,00 ± 0,55 | 0,94 ± 0,72 | 0,84 ± 0,67 | 0,52 ± 0,50 | 0,205 | 0,081 | 0,479 |
| <i>MHC2B</i> | 1,00 ± 0,59 | 0,86 ± 0,52 | 0,80 ± 0,49 | 0,55 ± 0,49 | 0,278 | 0,144 | 0,760 |
| <i>MHC2X</i> | 1,00 ± 0,44 | 0,74 ± 0,31 | 0,73 ± 0,54 | 0,65 ± 0,48 | 0,294 | 0,093 | 0,634 |
| <i>M. rectus femoris</i> | | | | | | | |
| <i>MHC1</i> | 1,00 ± 1,00 | 1,47 ± 2,11 | 2,03 ± 2,25 | 2,75 ± 2,84 | 0,450 | 0,167 | 0,906 |
| <i>MHC2A</i> | 1,00 ± 0,57 | 0,50 ± 0,81 | 1,06 ± 0,73 | 1,22 ± 1,21 | 0,559 | 0,197 | 0,258 |
| <i>MHC2B</i> | 1,00 ± 0,78 | 0,91 ± 1,53 | 1,48 ± 1,27 | 1,22 ± 1,36 | 0,699 | 0,365 | 0,858 |
| <i>MHC2X</i> | 1,00 ± 0,54 | 0,68 ± 0,57 | 0,97 ± 0,65 | 1,08 ± 0,81 | 0,625 | 0,390 | 0,334 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.
 Abk.: MHC1=Major Histocompatibility Complex I, MHC2A=Major Histocompatibility Complex IIa, MHC2B=Major Histocompatibility Complex IIb, MHC2X=Major Histocompatibility Complex IIx

Tabelle 4.10: Relative mRNA-Konzentrationen von Regulatoren der Muskelfasertransformation im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{ada} | NIA _{ada} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| <i>M. gastrocnemius</i> | | | | | | | |
| <i>PPARGC1A</i> | 1,00 ± 0,51 | 1,64 ± 0,65 | 1,11 ± 0,56 | 1,17 ± 0,85 | 0,179 | 0,406 | 0,108 |
| <i>PPARGC1B</i> | 1,00 ± 0,50 | 1,38 ± 0,49 | 1,00 ± 0,79 | 1,06 ± 0,74 | 0,322 | 0,158 | 0,469 |
| <i>PPARD</i> | 1,00 ± 0,77 | 1,21 ± 0,47 | 1,03 ± 0,80 | 0,89 ± 0,57 | 0,863 | 0,540 | 0,471 |
| <i>M. rectus femoris</i> | | | | | | | |
| <i>PPARGC1A</i> | 1,00 ± 0,69 | 1,69 ± 1,47 | 1,01 ± 0,74 | 1,89 ± 1,43 | 0,045 | 0,806 | 0,883 |
| <i>PPARGC1B</i> | 1,00 ± 0,84 | 1,39 ± 0,74 | 1,58 ± 0,46 | 1,67 ± 0,68 | 0,293 | 0,057 | 0,492 |
| <i>PPARD</i> | 1,00 ± 0,75 | 1,78 ± 0,84 | 1,95 ± 0,74 | 1,83 ± 0,57 | 0,161 | 0,033 | 0,066 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.
 Abk.: PPARGC1A=Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α , PPARGC1B=Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 β , PPARD=Peroxisome proliferator-activated receptor delta

4.6.2 mRNA-Konzentrationen von Genen der Angiogenese, der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Um den biochemischen Phänotyp der Muskeln besser beurteilen zu können, wurden im Folgenden die mRNA-Konzentrationen verschiedener Gene, deren Expression charakteristisch für einen Muskelfaserswitch ist, untersucht. In den Muskeln *M. gastrocnemius* und *M. rectus femoris* wurden die mRNA-Konzentrationen von Genen der angiogenen Faktoren VEGFA und VEGFB, von Enzymen der Atmungskette, wie die COX4I1 und die COX6A2 und von einem Enzym des Citratzyklus der SDHA bestimmt.

Im *M. gastrocnemius* waren keinerlei Gruppenunterschiede bezüglich der mRNA-Konzentrationen von VEGFB, COX6A2 und SDHA zu beobachten. Die mRNA-Konzentration des VEGFA wurde durch die hohe Niacinsupplementierung vermindert. Die mRNA-Konzentration des COX4I1 war durch das Ausdauertraining erhöht (Tabelle 4.11).

Im *M. rectus femoris* war zu beobachten, dass die hohe Niacinsupplementierung einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Konzentration der SDHA hatte und diese minderte, während durch die hohe Niacinsupplementierung die mRNA-Konzentrationen von VEGFA erhöht war. Ausdauertraining hatte keinen Effekt auf die untersuchten mRNA-Konzentrationen und es gab auch keine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Relative mRNA-Konzentrationen von Genen der Angiogenese, der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | | |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|-------|--------|
| | Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | | |
| <i>M. gastrocnemius</i> | | | | | | | | |
| VEGFA | 1,00 ± 0,46 | 1,12 ± 0,45 | 0,76 ± 0,23 | 0,71 ± 0,28 | 0,812 | 0,016 | 0,509 | |
| VEGFB | 1,00 ± 0,41 | 0,95 ± 0,19 | 0,88 ± 0,35 | 0,79 ± 0,33 | 0,525 | 0,204 | 0,892 | |
| COX4I1 | 1,00 ± 0,30 | 1,58 ± 0,63 | 1,21 ± 0,53 | 1,41 ± 0,58 | 0,021 | 0,953 | 0,283 | |
| COX6A2 | 1,00 ± 0,36 | 1,11 ± 0,40 | 0,99 ± 0,53 | 1,08 ± 0,53 | 0,486 | 0,913 | 0,983 | |
| SDHA | 1,00 ± 0,37 | 1,22 ± 0,42 | 1,07 ± 0,35 | 1,05 ± 0,27 | 0,357 | 0,634 | 0,302 | |
| <i>M. rectus femoris</i> | | | | | | | | |
| VEGFA | 1,00 ± 0,46 | 1,17 ± 0,72 | 1,56 ± 0,63 | 1,65 ± 0,76 | 0,692 | 0,013 | 0,713 | |
| VEGFB | 1,00 ± 0,51 | 0,76 ± 0,35 | 0,89 ± 0,24 | 0,97 ± 0,45 | 0,378 | 0,422 | 0,253 | |
| COX4I1 | 1,00 ± 0,53 | 0,86 ± 0,51 | 0,98 ± 0,36 | 1,24 ± 0,64 | 0,753 | 0,298 | 0,223 | |
| COX6A2 | 1,00 ± 0,66 | 0,87 ± 0,72 | 1,19 ± 0,89 | 1,25 ± 0,47 | 0,870 | 0,133 | 0,455 | |
| SDHA | 1,00 ± 0,14 | 1,00 ± 0,19 | 0,95 ± 0,32 | 0,72 ± 0,18 | 0,092 | 0,009 | 0,099 | |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

Abk.: COX4I1=Cytochrome C Oxidase Subunit IV Isoform 1, COX6A2=Cytochrome C Oxidase Subunit VIa Polypeptide 2, SDHA=Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A, VEGFA=Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGFB=Vascular Endothelial Growth Factor B

4.6.3 mRNA-Konzentrationen von Genen der Angiogenese, der oxidativen Phosphorylierung und des Citratzyklus im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Zur weiteren Untersuchung des biochemischen Phänotyps der Muskulatur wurden die Genexpressionen von Genen des Fettsäurenmetabolismus analysiert. Dazu wurden die mRNA-Konzentrationen der an der Fettsäurenverwertung beteiligten Gene (CPT1B codierend für die Carnitin Palmitoyltransferase 1b, CACT (SLC25A20) codierend für die Carnitin-Acylcarnitin Translokase, OCTN1 (SLC22A4) codierend für den *novel organic cation transporter 1*, OCTN2 (SLC22A5) codierend für den *novel organic cation transporter 2* und FATP (SLC27A1) codierend für das *fatty acid transport protein*) untersucht. Darüber hinaus wurden Gene des Fettsäuretransports, der Fettsäureaufnahme (FAT/CD36 codierend für die *fatty acid translokase* und LPL codierend für die Lipoproteinlipase), sowie Gene der Fettsäureoxidation (LCAD codierend für die *long chain acyl-CoA dehydrogenase* und MCAD codierend für die *medium chain acyl-CoA dehydrogenase*) analysiert.

Im *M. gastrocnemius* war zu beobachten, dass es keinen Einfluss von Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf die mRNA-Konzentrationen von OCTN1, OCTN2, CACT, FATP, MCAD und LCAD gab. Ebenso lag keine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf die eben genannten Parameter vor. Die mRNA-Konzentration des CPT1B war signifikant durch die hohe Niacinsupplementierung vermindert. Die mRNA-Konzentrationen von LPL und CD36 zeigten eine durch das Ausdauertraining vermittelte Minderung (Tabelle 4.12).

Im *M. rectus femoris* wurden die mRNA-Konzentrationen der Gene OCTN2, CPT1B, CACT, FATP, MCAD, LCAD, LPL und CD36 weder durch das Ausdauertraining, noch durch die Niacinsupplementierung beeinflusst. Auch eine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf die eben genannten Parameter war nicht nachzuweisen. Lediglich die mRNA-Konzentration des OCTN1 wurde durch die hohe Niacinsupplementierung erhöht (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Relative mRNA-Konzentrationen von Genen des Fettsäuretransports und des Fettsäuremetabolismus im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|-------|
| | Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| <i>M. gastrocnemius</i> | | | | | | | |
| <i>OCTN1</i> | 1,00 ± 0,39 | 1,04 ± 0,60 | 0,84 ± 0,37 | 0,81 ± 0,67 | 0,958 | 0,299 | 0,859 |
| <i>OCTN2</i> | 1,00 ± 0,25 | 1,02 ± 0,46 | 0,79 ± 0,38 | 0,84 ± 0,55 | 0,824 | 0,072 | 0,966 |
| <i>CPT1B</i> | 1,00 ± 0,37 | 1,08 ± 0,41 | 0,75 ± 0,18 | 0,64 ± 0,24 | 0,856 | 0,001 | 0,332 |
| <i>CACT</i> | 1,00 ± 0,31 | 1,13 ± 0,31 | 1,06 ± 0,29 | 0,97 ± 0,42 | 0,850 | 0,648 | 0,349 |
| <i>FATP</i> | 1,00 ± 0,22 | 1,01 ± 0,39 | 1,13 ± 0,47 | 0,89 ± 0,53 | 0,215 | 0,708 | 0,353 |
| <i>MCAD</i> | 1,00 ± 0,56 | 1,04 ± 0,61 | 0,99 ± 0,64 | 1,01 ± 0,66 | 0,876 | 0,933 | 0,949 |
| <i>LCAD</i> | 1,00 ± 0,46 | 1,04 ± 0,36 | 1,10 ± 0,53 | 0,95 ± 0,40 | 0,719 | 0,976 | 0,524 |
| <i>LPL</i> | 1,00 ± 0,43 | 0,67 ± 0,32 | 0,81 ± 0,31 | 0,63 ± 0,34 | 0,017 | 0,394 | 0,654 |
| <i>CD36</i> | 1,00 ± 0,49 | 0,81 ± 0,34 | 1,31 ± 0,49 | 0,89 ± 0,52 | 0,040 | 0,191 | 0,426 |
| <i>M. rectus femoris</i> | | | | | | | |
| <i>OCTN1</i> | 1,00 ± 0,32 | 1,06 ± 0,42 | 1,34 ± 0,40 | 1,28 ± 0,43 | 0,999 | 0,039 | 0,661 |
| <i>OCTN2</i> | 1,00 ± 0,37 | 1,21 ± 0,57 | 1,20 ± 0,40 | 1,17 ± 0,50 | 0,557 | 0,622 | 0,422 |
| <i>CPT1B</i> | 1,00 ± 0,31 | 1,30 ± 0,56 | 1,30 ± 0,44 | 1,30 ± 0,48 | 0,346 | 0,255 | 0,302 |
| <i>CACT</i> | 1,00 ± 0,39 | 0,92 ± 0,34 | 1,07 ± 0,38 | 1,05 ± 0,21 | 0,636 | 0,398 | 0,755 |
| <i>FATP</i> | 1,00 ± 0,44 | 0,95 ± 0,23 | 1,40 ± 0,45 | 1,01 ± 0,38 | 0,092 | 0,071 | 0,175 |
| <i>MCAD</i> | 1,00 ± 0,29 | 0,98 ± 0,37 | 0,97 ± 0,38 | 0,85 ± 0,30 | 0,556 | 0,509 | 0,675 |
| <i>LCAD</i> | 1,00 ± 0,26 | 1,09 ± 0,43 | 0,88 ± 0,36 | 1,00 ± 0,42 | 0,430 | 0,413 | 0,924 |
| <i>LPL</i> | 1,00 ± 0,49 | 0,77 ± 0,64 | 0,94 ± 0,46 | 1,06 ± 0,49 | 0,410 | 0,330 | 0,178 |
| <i>CD36</i> | 1,00 ± 0,80 | 1,09 ± 0,80 | 1,11 ± 0,53 | 1,03 ± 0,57 | 0,879 | 0,638 | 0,564 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

Abk.: CACT=Carnitin-Acylcarnitin Carrier, CD36=fatty Acid Translocase, CPT1B=Carnitin Palmitoyltransferase 1B, FATP=Fatty Acid Transport Protein 1, LCAD=Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, LPL=Lipoproteinlipase, MCAD=Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, OCTN1=Novel organic cation transporter 1, OCTN2=Novel organic cation transporter 2

4.6.4 mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Um den Einfluss der Intervention Ausdauertraining, Niacinsupplementierung und der Kombination aus Ausdauertraining und Niacinsupplementierung auf den Kohlenhydratmetabolismus zu untersuchen, wurden im Weiteren die mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* untersucht. Dazu wurden die mRNA-Konzentrationen von Genen der Glycolyse (GAPDH codierend für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, LDHA codierend für die Lactat-Dehydrogenase A und PFKM codierend für die muskuläre Phosphofruktokinase), der Glycogenolyse (PHKA1 codierend für die muskuläre Phosphorylasekinase α 1 und PYGM codierend für die Glycogenphosphorylase) und der Glycogensynthese (GYS1 codierend für die Glycogensynthase 1) analysiert.

Im *M. gastrocnemius* waren durch die hohe Niacinsupplementierung signifikant erhöhte mRNA-Konzentrationen bei fünf von sechs Genen (GAPDH, PFKM, PHKA1, PYGM und GYS1) nachweisbar. Ausdauertraining hatte nur einen steigernden Effekt auf die mRNA-Konzentration von PYGM und tendenziellen Einfluss ($p < 0,15$) auf die mRNA-Konzentration von GYS1. Auch die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung wirkte sich nur positiv auf die mRNA-Konzentration von PYGM aus. Die mRNA-Konzentrationen von LDHA wurden weder durch das Ausdauertraining, noch die Niacinsupplementierung beeinflusst, noch lag eine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung vor (Tabelle 4.13).

Auch im *M. rectus femoris* hatte die hohe Niacinsupplementierung einen positiven Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen bei vier der sechs gemessenen Gene (GAPDH, PHKA1, PYGM und GYS1). Die mRNA-Konzentrationen von LDHA und PFKM wurden durch die Niacinsupplementierung nicht beeinflusst. Ein Effekt von Ausdauertraining auf die hier gemessenen mRNA-Konzentrationen war nicht nachweisbar. Ebenso lag keine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung vor (Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Relative mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris* der Mäuse nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| | | | | | AT | NIA | ATxNIA |
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | | | |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| <i>M. gastrocnemius</i> | | | | | | | |
| <i>GAPDH</i> | 1,00 ± 0,61 | 1,42 ± 0,49 | 1,79 ± 0,79 | 1,71 ± 0,37 | 0,375 | 0,008 | 0,203 |
| <i>LDHA</i> | 1,00 ± 0,59 | 1,21 ± 0,61 | 1,50 ± 0,51 | 1,20 ± 0,34 | 0,792 | 0,084 | 0,147 |
| <i>PFKM</i> | 1,00 ± 0,70 | 1,43 ± 0,51 | 1,93 ± 0,41 | 1,90 ± 0,76 | 0,347 | 0,003 | 0,303 |
| <i>PHKA1</i> | 1,00 ± 0,67 | 1,50 ± 0,61 | 1,86 ± 0,72 | 1,79 ± 0,87 | 0,205 | 0,018 | 0,076 |
| <i>PYGM</i> | 1,00 ± 0,63 ^b | 1,84 ± 0,77 ^a | 2,34 ± 0,85 ^a | 2,28 ± 0,94 ^a | 0,037 | 0,001 | 0,016 |
| <i>GYS1</i> | 1,00 ± 0,88 | 1,48 ± 0,81 | 1,59 ± 0,76 | 1,97 ± 0,99 | 0,056 | 0,019 | 0,329 |
| <i>M. rectus femoris</i> | | | | | | | |
| <i>GAPDH</i> | 1,00 ± 0,35 | 1,02 ± 0,40 | 1,54 ± 0,49 | 1,68 ± 0,58 | 0,623 | 0,001 | 0,728 |
| <i>LDHA</i> | 1,00 ± 0,46 | 0,97 ± 0,40 | 1,05 ± 0,41 | 0,81 ± 0,29 | 0,320 | 0,679 | 0,427 |
| <i>PFKM</i> | 1,00 ± 0,53 | 0,88 ± 0,19 | 1,04 ± 0,35 | 1,12 ± 0,48 | 0,902 | 0,432 | 0,299 |
| <i>PHKA1</i> | 1,00 ± 0,54 | 1,39 ± 0,69 | 1,81 ± 0,60 | 2,13 ± 0,84 | 0,065 | 0,001 | 0,397 |
| <i>PYGM</i> | 1,00 ± 0,64 | 1,16 ± 0,62 | 1,49 ± 0,57 | 1,79 ± 0,97 | 0,372 | 0,021 | 0,751 |
| <i>GYS1</i> | 1,00 ± 0,74 | 1,21 ± 0,33 | 1,93 ± 0,78 | 1,55 ± 0,46 | 0,658 | 0,004 | 0,162 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch a,b,c gekennzeichnet.

Abk.: GAPDH=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GYS1=Glycogensynthase 1 (muskulär), LDHA=Lactat-Dehydrogenase A, PFKM=Phosphofruktokinase (muskulär), PHKA1=Phosphorylasekinase α 1 (muskulär), PYGM=Glycogenphosphorylase (muskulär)

4.6.5 Relative Proteinkonzentrationen von PGC-1 α und GAPDH im *M. gastrocnemius* und im *M. rectus femoris*

Im Weiteren wurden beispielhaft Proteinkonzentrationen von Proteinen, die in der Glycolyse (GAPDH) und als Hauptregulator der Muskelfaserzusammensetzung (PGC-1 α) eine Rolle spielen, untersucht.

Im *M. gastrocnemius* wurde die relative Proteinkonzentration von GAPDH weder durch das Ausdauertraining, noch durch die Niacinsupplementierung beeinflusst, noch lag eine Interaktion der Haupteffekte vor (Tabelle 4.14 und Abbildung 4.3 A)).

Die Niacinsupplementierung hatte einen tendenziell positiven Einfluss ($p < 0,15$) auf die relative Proteinkonzentration von PGC-1 α , der durch die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung jedoch gemindert wurde. Die hohe Niacinsupplementierung ohne Ausdauertraining wirkte also erhöhend auf die relativen Proteinkonzentrationen von PGC-1 α , mit Ausdauertraining hatte eine hohe Niacinsupplementierung allerdings einen geegläufigen Effekt (Tabelle 4.14 und Abbildung 4.3 B)).

Im *M. rectus femoris* hatten weder das Ausdauertraining, noch die Niacinsupplementierung einen Einfluss auf die relativen RNA-Konzentrationen von GAPDH und PGC-1 α und es lag auch keine Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung vor (Tabelle 4.15 und Abbildung 4.4 A) und B)).

Tabelle 4.14: Relative Proteinkonzentrationen von GAPDH und PGC-1 α im *M. gastrocnemius* von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | | |
|------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------------------|--------|
| | Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | | |
| GAPDH | 1,00 ± 0,21 | 0,98 ± 0,21 | 1,10 ± 0,46 | 0,93 ± 0,36 | 0,428 | 0,812 | 0,530 | |
| PGC-1 α | 1,00 ± 0,14 | 1,26 ± 0,43 | 1,60 ± 0,59 | 1,16 ± 0,47 | 0,571 | 0,133 | 0,037 ¹ | |

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung für n=8 Tiere/Gruppe.

¹hier im Bonferroni-post-hoc Test nicht signifikant.

Abk.: GAPDH=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, PGC-1 α =Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α

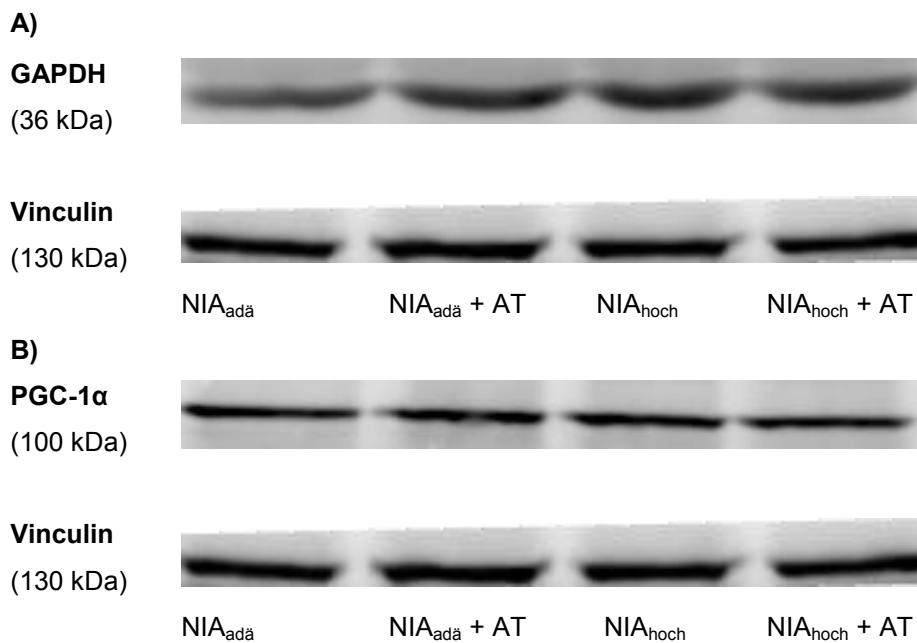


Abbildung 4.3: Repräsentative Immunoblots für GAPDH (A) und PGC-1 α (B) und Vinculin als interne Kontrolle im *M. gastrocnemius* jeweils eines Tieres der Versuchsgruppen nach 6-wöchiger Versuchsperiode

Tabelle 4.15: Relative Proteinkonzentrationen von GAPDH und PGC-1 α im *M. rectus femoris* von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | | |
|------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|-------|--------|
| | Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | | |
| GAPDH | 1,00 \pm 0,21 | 1,17 \pm 0,23 | 1,05 \pm 0,28 | 1,24 \pm 0,39 | 0,098 | 0,572 | 0,925 | |
| PGC-1 α | 1,00 \pm 0,10 | 0,89 \pm 0,16 | 1,03 \pm 0,36 | 0,85 \pm 0,19 | 0,089 | 0,912 | 0,654 | |

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung für n=8 Tiere/Gruppe.

Abk.: GAPDH=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, PGC-1 α =Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α

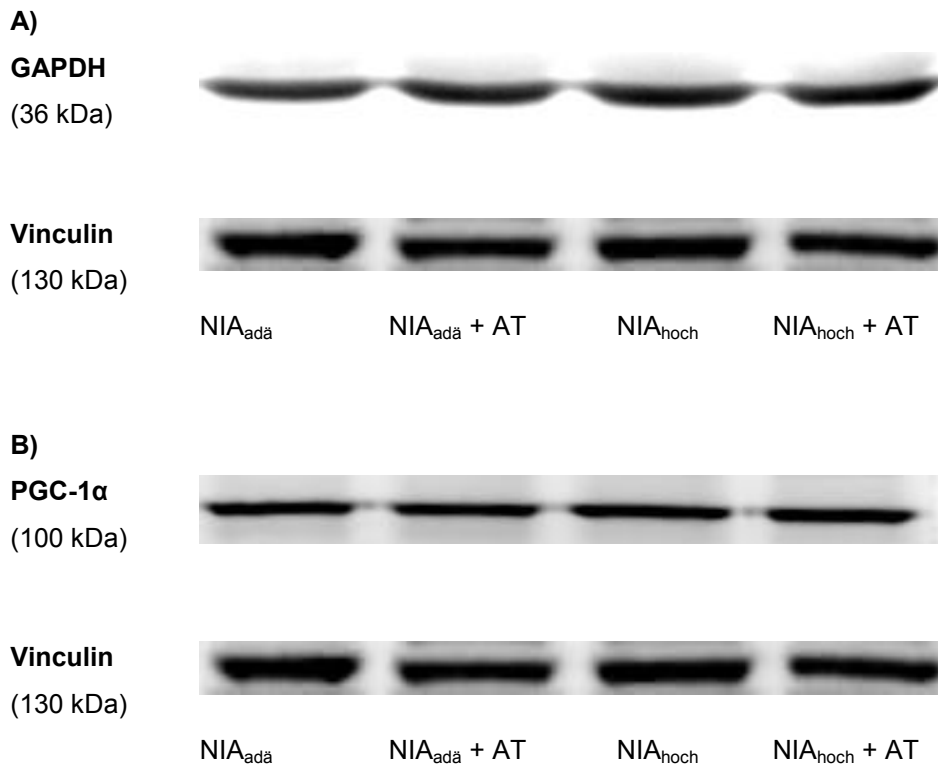


Abbildung 4.4: Repräsentative Immunoblots für GAPDH (A) und PGC-1 α (B) und Vinculin als interne Kontrolle im *M. rectus femoris* jeweils eines Tieres der Versuchsgruppen nach 6-wöchiger Versuchsperiode

4.7 Expression von Genen des Fettsäuretransports, des Fettsäuremetabolismus und des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber

Um die Einflüsse des Ausdauertrainings, der Niacinsupplementierung und der Kombination aus beidem in der Leber zu untersuchen, wurden die mRNA-Konzentrationen von Genen der Lipogenese (ACACA codierend für die Acetyl-Coenzym A (CoA) Carboxylase Alpha, GPAT codierend für die Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase, FASN codierend für die *Fatty Acid Synthase* und SREBP1c codierend für *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*), der mitochondrialen β -Oxidation (LCAD codierend für *Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*, MCAD codierend für *Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*), einer der Hauptregulatoren der Fettsäurenverwertung (PPARA codierend für den *Peroxisome proliferator-activated receptor α*), der Fettsäurenverwertung (CPT1A codierend für die Carnitin Palmitoyltransferase 1A und OCTN2 codierend für *den Novel organic cation transporter 2*), des Carnitinstoffwechsels (BBD codierend für die γ -Butyrobetain Dioxygenase) und des Citratzyklus (SDHA codierend für die Untereinheit A der Succinat Dehydrogenase) untersucht.

4.7.1 mRNA-Konzentrationen von Genen des Fettsäuretransports und des Fettsäuremetabolismus in der Leber

In der Leber hatte die hohe Niacinsupplementierung einen tendenziell mindernden Einfluss ($p < 0,15$) auf die mRNA-Konzentrationen von FASN, GPAT und CPT1A, der durch die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung bei der mRNA-Konzentration von CPT1A ins Gegenteil gekehrt wurde, sodass die mRNA-Konzentrationen von CPT1A durch die Wechselwirkung wieder erhöht wurde. Ebenso lag eine Interaktion von Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf die mRNA-Konzentrationen von SREBP1c und ACACA vor. Die Wechselwirkung war jedoch beim nachfolgenden post-hoc Test nicht signifikant. Auf die mRNA-Konzentrationen von BBD, OCTN2, MCAD, LCAD, PPARA und SDHA hatten weder das Ausdauertraining, noch die Niacinsupplementierung einen Einfluss, noch lag eine Interaktion der Haupteffekte vor (Tabelle 4.16).

Tabelle 4.16: Relative mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Genen des Fettsäurenstoffwechsels und des Citratzyklus in der Leber von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | | |
|------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------------------|--------|
| | Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | | |
| <i>ACACA</i> | 1,00 ± 0,62 | 0,61 ± 0,22 | 0,66 ± 0,34 | 0,94 ± 0,52 | 0,718 | 0,949 | 0,025 ¹ | |
| <i>FASN</i> | 1,00 ± 0,46 | 0,72 ± 0,45 | 0,55 ± 0,28 | 0,74 ± 0,33 | 0,761 | 0,099 | 0,075 | |
| <i>GPAT</i> | 1,00 ± 0,54 | 1,57 ± 0,91 | 1,01 ± 0,54 | 0,83 ± 0,26 | 0,388 | 0,093 | 0,073 | |
| <i>SREBP1c</i> | 1,00 ± 0,53 | 0,49 ± 0,26 | 0,62 ± 0,47 | 0,80 ± 0,28 | 0,200 | 0,766 | 0,013 ¹ | |
| <i>BBD</i> | 1,00 ± 0,54 | 0,94 ± 0,79 | 0,86 ± 0,46 | 0,91 ± 0,60 | 0,741 | 0,792 | 0,596 | |
| <i>CPT1A</i> | 1,00 ± 0,63 | 1,02 ± 1,50 | 0,91 ± 0,60 | 1,66 ± 0,51 | 0,275 | 0,096 | 0,021 ¹ | |
| <i>OCTN2</i> | 1,00 ± 0,53 | 0,88 ± 0,78 | 1,20 ± 0,77 | 0,64 ± 0,26 | 0,097 | 0,945 | 0,389 | |
| <i>MCAD</i> | 1,00 ± 0,34 | 1,16 ± 0,39 | 1,33 ± 0,35 | 1,16 ± 0,30 | 0,980 | 0,169 | 0,177 | |
| <i>LCAD</i> | 1,00 ± 0,56 | 1,15 ± 0,52 | 1,34 ± 0,53 | 1,17 ± 0,62 | 0,968 | 0,344 | 0,389 | |
| <i>PPARA</i> | 1,00 ± 0,59 | 0,94 ± 0,49 | 0,92 ± 0,50 | 0,68 ± 0,36 | 0,529 | 0,440 | 0,368 | |
| <i>SDHA</i> | 1,00 ± 0,30 | 1,16 ± 0,19 | 1,14 ± 0,22 | 1,08 ± 0,20 | 0,477 | 0,695 | 0,140 | |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

¹hier im Bonferroni-post-hoc Test nicht signifikant.

Abk.: ACACA=Acetyl-CoA Carboxylase Alpha, BBD=γ-Butyrobetain Dioxygenase, CPT1A=Carnitin Palmitoyltransferase 1A, FASN=Fatty Acid Synthase, GPAT=Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase, LCAD=Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, MCAD=Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, OCTN2=Novel organic cation transporter 2, PPARA=Peroxisome proliferator-activated receptor α, SDHA=Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A, SREBP1c=Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c

4.7.2 mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber

Um den Einfluss der verschiedenen Behandlungen (Ausdauertraining, Niacinsupplementierung und der Kombination aus beidem) weitergehend zu untersuchen, wurden die Gene des Kohlenhydratstoffwechsels in der Leber betrachtet. Dazu wurden die mRNA-Konzentrationen von Genen der Glycolyse wie der GAPDH, der LDHA und der PFKL (codierend für die hepatische Phosphofructokinase), der Glycogenolyse (PYGL codierend für die hepatische Phosphofructokinase) und der Glycogensynthese (GYS2 codierend für die hepatische Glycogensynthase 2) analysiert.

Weder das Ausdauertraining, noch die Niacinsupplementierung hatten einen Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen von GAPDH, LDHA, PFKL, PYGL und GYS2. Ebenso war keine Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung nachweisbar (Tabelle 4.17).

Tabelle 4.17: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber von Mäusen nach 6-wöchiger Versuchsperiode

| | NIA _{adä} | NIA _{adä} + AT | NIA _{hoch} | NIA _{hoch} + AT | P-Wert | | |
|---------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|--------|-------|--------|
| Niacin (mg/kg Diät) | 30 | 30 | 750 | 750 | AT | NIA | ATxNIA |
| Ausdauertraining | - | + | - | + | | | |
| <i>GAPDH</i> | 1,00 ± 0,59 | 0,73 ± 0,47 | 0,63 ± 0,22 | 0,60 ± 0,20 | 0,291 | 0,159 | 0,392 |
| <i>LDHA</i> | 1,00 ± 0,32 | 0,85 ± 0,51 | 0,92 ± 0,92 | 0,83 ± 0,42 | 0,550 | 0,804 | 0,864 |
| <i>PFKL</i> | 1,00 ± 0,40 | 0,82 ± 0,32 | 0,75 ± 0,23 | 0,83 ± 0,18 | 0,659 | 0,231 | 0,190 |
| <i>PYGL</i> | 1,00 ± 0,47 | 1,04 ± 0,57 | 0,69 ± 0,24 | 0,91 ± 0,42 | 0,363 | 0,122 | 0,548 |
| <i>GYS2</i> | 1,00 ± 0,25 | 0,79 ± 0,27 | 1,00 ± 0,52 | 1,09 ± 0,67 | 0,685 | 0,328 | 0,347 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung für n=10 Tiere/Gruppe.

Abk.: GAPDH=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GYS2=Glycogensynthase 2 (hepatisch), LDHA=Lactat-Dehydrogenase A, PFKL=Phosphofructokinase (hepatisch), PYGL=Glycogenphosphorylase (hepatisch)

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit basiert auf drei Hypothesen. Zum einen wird unterstellt, dass eine hohe Niacinsupplementierung die Ausdauerleistungsfähigkeit verbessert. Die zweite Hypothese, die untersucht wird, besagt, dass durch eine hohe Niacinsupplementierung die Ausdauerleistungsfähigkeit in vergleichbarem Ausmaß wie durch Ausdauertraining verbessert werden kann. Die dritte Hypothese geht davon aus, dass durch eine hohe Niacinsupplementierung in Kombination mit regelmäßigem Ausdauertraining die Ausdauerleistungsfähigkeit bei Mäusen mehr gesteigert werden kann, als es alleiniges Ausdauertraining oder alleinige hohe Niacinsupplementierung kann.

Basis dieser Hypothesen sind die Beobachtungen aus vorhergehenden Studien die zeigen, dass durch eine Niacinsupplementierung PPAR δ und PGC-1 α erhöht sind. Diese gelten als Hauptregulatoren von Genen des Fettstoffwechsels, der Mitochondrienaktivität, dem Tricarbonsäurezyklus, der Atmungskette und der Angiogenese⁵¹. Als Konsequenz der Aktivierung von PPAR δ und PGC-1 α , induziert durch eine hohe Niacinsupplementierung, werden darauf folgend Gene des Fettsäuretransports, der β -Oxidation, des Tricarbonsäurezyklus, der Atmungskette und der Angiogenese erhöht, was auf einen veränderten Muskelphänotyp schließen lässt, durch den Fettsäuren vermehrt verwertet werden können⁵²⁻⁵⁴.

Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass es durch alleiniges regelmäßiges Ausdauertraining zu einer Erhöhung sowohl der Hauptregulatoren PGC-1 α , PGC-1 β und PPAR δ , als auch nachfolgend der Gene der Fettsäuren-Verwertung, Mitochondrienaktivität und Angiogenese kommt^{60,65,71,78,107-112}. Diese Adaptionen treten in Kombination mit einer erhöhten Ausdauerleistungsfähigkeit auf^{113,114}.

Ein weiterer Effekt, den sowohl Niacin als auch Ausdauertraining haben kann, ist eine Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung. So konnte eine hohe Niacinsupplementierung bei Zuckerratten, Schafen und Schweinen eine Änderung der Muskelfaserzusammensetzung von glykolytischen Typ II-Fasern zu oxidativen Typ I-Fasern hervorrufen⁵²⁻⁵⁴. Diese Anpassungsreaktion der Muskelfaserzusammensetzung und des Muskelphänotyps wird auch durch alleiniges regelmäßiges Ausdauertraining induziert und dadurch mit einer erhöhten Ausdauerleistungsfähigkeit in Verbindung gebracht¹¹⁵.

Es ist weiterhin bekannt, dass Niacin TG- und LDL-Konzentrationen im Blut senken und HDL-Konzentrationen anheben kann. Beim Menschen werden daher 1-2 g Niacin/d in der Therapie von Dyslipoproteinämien, die eine der Hauptursachen der Artherosklerosen darstellen, eingesetzt^{14,40,43,116}. Der zugrunde liegende Mechanismus der lipidsenkenden Wirkung des Niacins konnte bisher jedoch noch nicht vollständig beschrieben werden. Ein erhöhter Anteil der Typ I-Muskelfasern könnte daher die aus der Literatur bekannte und sich in der Praxis zu Nutzen gemachte, lipidsenkende Wirkung des Niacins dadurch klären, dass ein veränderter Muskelphänotyp mit mehr oxidativen Typ I-Muskelfasern in erhöhtem Ausmaß Fettsäuren verwerten würde, wodurch Blutfettwerte gesenkt werden können.

Da die Untersuchungen in dieser Arbeit an Mäusen erfolgten und diese eine höhere Stoffwechselrate haben als große Säugetiere, muss für eine vergleichende Betrachtung der Dosierung des Niacins in der Diät der Mäuse die metabolische Körpermasse ($\text{kg KG}^{0,75}$) mit einbezogen werden¹¹⁷. Wie schon beschrieben werden in der Humanmedizin zur Therapie von Dyslipoproteinämien 1-2 g/d verwendet¹¹⁸. Bei einer Verwendung von 1 g Niacin bei einer Person mit einem Körpergewicht von 70 kg, entspricht das 41,3 mg Niacin/kg $\text{KG}^{0,75}$. Die eingesetzte Niacin-Dosierung bei den Mäusen mit der hohen Niacinsupplementierung betrug 750 mg/kg Diät, was ca. 38,1 mg Niacin/kg $\text{KG}^{0,75}$ entspricht, also einer praxisrelevanten Dosierung. In anderen Studien wurden ca. 66 mg/kg $\text{KG}^{0,75}$ bei Schafen oder ca. 35 mg Niacin/kg $\text{KG}^{0,75}$ bei Ratten eingesetzt^{52, 53}.

Die bedarfsdeckende (=adäquate) Niacindiät ($\text{NIA}_{\text{adä}}$) der Mäuse hatte eine Dosierung von 30 mg Niacin/kg Diät. Das entspricht der Empfehlung für die AIN-93G Standarddiät für Mäuse des *American Institute of Nutrition* und ist ausreichend für die Deckung des Niacinbedarfs⁹⁴.

Die Versuchsdauer von sechs Wochen ist darin begründet, dass aus der Literatur bekannt ist, dass in diesem Zeitraum sowohl Adaptionen an regelmäßiges Ausdauertraining, als auch Adaptionen an eine hohe Niacinsupplementierung auftreten^{52-54,119-124}.

Wirkung von Niacin und Ausdauertraining auf die Ausdauerleistungsfähigkeit der Mäuse

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Ausdauertraining positiv auf die Ausdauerleistungsfähigkeit auswirkt^{60,120}. Das konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da das Ausdauertraining signifikant erhöhte Werte ($p = 0,001$) aller Parameter, die im Rahmen der Ausdauerleistungsfähigkeit gemessen werden (Distanz, $VO_2\text{max}$, Geschwindigkeit und Dauer), hervorruft. Ebenso wurde eine verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit durch eine alleinige hohe Niacinsupplementierung erwartet, da aus der Literatur hervorgeht, dass eine hohe Niacinsupplementierung mit einem erhöhten oxidativen Muskelphänotyp einhergeht⁵²⁻⁵⁴. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass durch eine alleinige hohe Niacinsupplementierung keine verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit induziert wird. Betrachtet man hingegen die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung so zeigt sich, dass die Ausdauerleistungsfähigkeit dadurch am stärksten verbessert wird. Diese Wechselwirkung besagt, dass die Wirkung des Ausdauertrainings kombiniert mit der hohen Niacinsupplementierung höher ist als bei der adäquaten Niacinsupplementierung. Die Mäuse der Gruppe mit der Kombination aus Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung zeigten die stärksten signifikanten Verbesserungen in allen vier gemessenen Parametern (Distanz, Dauer, Geschwindigkeit und $VO_2\text{max}$). Die Parameter Distanz und Dauer dieser Gruppe zeigten sogar eine signifikante Erhöhung gegenüber der Gruppe, die ausschließlich das Ausdauertraining bekam. Die zusätzliche hohe Niacinsupplementierung zum Ausdauersport muss also Effekte auf den Organismus haben, die einen Leistungsvorteil ermöglichen.

Diese Ergebnisse geben schon hier erste Hinweise darauf, dass die verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit in der Gruppe mit der Kombination aus Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf zusätzliche Veränderungen im Organismus der Mäuse zurückzuführen ist, als auf den oxidativen Muskelphänotyp, der laut Literatur durch eine hohe Niacinsupplementierung induziert wird. Nichtsdestotrotz wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Einfluss von Niacin und Ausdauertraining auf den Muskelphänotyp untersucht, da die bekannte Literatur durchaus einen Einfluss vermuten lässt.

Einfluss von Niacin und Ausdauertraining auf die Muskelfaserzusammensetzung und den Muskelphänotyp

Die Muskelfaserzusammensetzung bestimmt die kontraktile Eigenschaften des Muskels. Das Sarkomer bildet eine kontraktile Funktionseinheit, die als kontraktile Proteine Aktin und Myosin enthält⁵⁷. Die Muskelfaserzusammensetzung kann über die Zusammensetzung verschiedener MHC-Isoformen, die als Marker benutzt werden, bestimmt werden. Es gibt zwei verschiedene Muskelfasertypen. Die Typ I-Muskelfasern beschreiben die *Slow-twitch*-Fasern. Diese sind relativ resistent gegenüber Ermüdung. Sie haben einen hohen Mitochondriengehalt und sind charakterisiert durch einen oxidativen Metabolismus. Ihre hauptsächliche Energiequelle sind Fettsäuren. Die Typ II-Muskelfasern sind die *Fast-twitch*-Muskelfasern. Sie werden unterteilt in Typ IIa, Typ IIb und Typ IIx. Im Gegensatz zu den Typ I-Fasern generieren sie Energie vor allem durch die Glykolyse. Die Typ IIb-Fasern sind dabei rein glykolytisch. Die Typ IIa- und IIx-Fasern sind gemischt-glykolytisch, das heißt sie können sowohl Kohlenhydrate als auch Fettsäuren benutzen, wobei die Kohlenhydrate den höheren Anteil ausmachen⁶⁰. Die Kontraktionskraft der Typ II-Fasern steigt daher auch von Typ IIa < IIx < IIb an⁶¹. Muskeln, die reich an Muskelfasern des Typ II sind, sind empfindlicher gegenüber Ermüdung⁶⁰.

In der vorliegenden Arbeit wurden Muskeln mit einer ähnlichen originären Muskelfaserzusammensetzung untersucht, sprich Muskeln, die einen hohen Anteil von Typ IIb-Fasern enthalten. Der *M. gastrocnemius* ist der Wadenmuskel und verantwortlich für die Beugung des Kniegelenkes. Er enthält bei Nagern viele Typ IIb-Fasern (ca. 50 %) und einen geringen Anteil von Typ I-Fasern (ca. 5 %)^{113,125}. Der *M. rectus femoris* ist ein Teil des *M. quadriceps femoris*. Er ist für die Streckung des Kniegelenkes und die Plantarflexion (Streckung des Sprunggelenkes) zuständig. Auch er enthält hauptsächlich Typ IIb-Fasern und hat einen geringen Anteil an Typ I-Fasern¹²⁶. Diese Auswahl der Muskeln ist wichtig, da vor allem in Muskeln mit einem hohen Typ II-Fasergehalt eine Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung, charakterisiert durch einen höheren Anteil an Typ I-Fasern und niedrigeren Anteil an Typ II-Fasern, gut sichtbar wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Niacinsupplementierung teilweise einen Effekt auf die Muskelfaserzusammensetzung hat. So waren im *M. gastrocnemius* der Anteil der MHC I-Fasern tendenziell ($p < 0,15$) und der Anteil der MHC IIa- und der MHC IIb-Fasern signifikant verändert. Während die hohe Niacinsupplementierung den Anteil der MHC I- und der MHC IIa-Fasern tendenziell ($p < 0,15$) erhöhte bzw. signifikant erhöhte, verminderte die hohe Niacinsupplementierung den Anteil der MHC IIb-Fasern. Im *M. rectus femoris* hatte die hohe Niacinsupplementierung einen steigernden Einfluss auf den Anteil der MHC IIx-Fasern. Weder das Ausdauertraining, noch eine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung beeinflusste die Muskelfaserzusammensetzung in den beiden Muskeln.

Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass nur geringe signifikante Veränderungen in der Muskelfaserzusammensetzung vorhanden sind, die durch die hohe Niacinsupplementierung zustande kommen. Eine Erhöhung der oxidativen Fasern (MHC I im *M. gastrocnemius*), bzw. der gemischt oxidativen Fasern (MHC IIx im *M. rectus femoris*) und zumindest im *M. gastrocnemius* eine Verminderung des MHC IIb-Faseranteils als glykolytische Fasern sind nachzuweisen. Dies passt nicht zu den Daten der Ausdauerleistungsfähigkeit, wo durchgehend keinerlei Veränderungen durch eine hohe Niacinsupplementierung vorhanden sind. Allerdings stehen die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf die Muskelfaserzusammensetzung zumindest teilweise im Einklang zu den Ergebnissen aus den Studien an Schwein und Schaf. In diesen Studien war die hohe Niacinsupplementierung in der Lage, eine Muskelfasertransformation von Typ II in Typ I herbeizuführen^{53,54}. In einer Studie an gesunden Ratten konnten, ebenso wie in dieser Arbeit, nur leichte Veränderungen in der Muskelfasertransformation hin zu einem erhöhten Anteil von Typ I-Fasern gezeigt werden. Der Effekt war jedoch nicht sehr stark in den Muskeln *gastrocnemius* und *rectus femoris*. In den Muskel *soleus* und *vastus intermedius* waren sogar gar keine Effekte sichtbar¹²⁴.

Der Grund für die stark verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit in der Gruppe mit der Kombination aus Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung kann durch die histologische Auswertung nicht erläutert werden und muss im Weiteren geklärt werden.

Einfluss von Niacin und Ausdauertraining auf die Schlüsselfaktoren PGC-1 α , PGC-1 β und PPAR δ der Muskelfaserzusammensetzung und des Muskelphänotyps

Davon ausgehend, dass die Muskelfasertransformation durch PGC-1 α , PGC-1 β und PPAR δ induziert wird, wurden in dieser Arbeit die mRNA-Konzentrationen dieser drei Regulatoren und die Protein-Konzentration von PGC-1 α bestimmt. Die Ergebnisse waren dabei durchaus heterogen.

Durch das alleinige Ausdauertraining waren die mRNA-Konzentrationen von PPARGC1A im *M. rectus femoris* signifikant erhöht. Die alleinige hohe Niacin-supplementierung hatte nur einen erhöhenden Effekt auf die mRNA-Konzentrationen von PPAR δ im *M. rectus femoris*. Ansonsten hatten das Ausdauertraining und die hohe Niacinsupplementierung in beiden Muskeln keinen Effekt auf die molekularen Regulatoren der Muskeltransformation, genausowenig lag eine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung vor.

Diese eher schwachen Effekte der hohen Niacinsupplementierung sind, wenn sie in Bezug zur Ausdauerleistungsfähigkeit gesetzt werden, nicht unerwartet, da diese durch die alleinige hohe Niacinsupplementierung auch nicht verändert wurden. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Arbeiten an Zuckerratte, Schwein und Schaf, bei denen schon eine alleinige Niacinsupplementierung die drei Hauptregulatoren der Muskelfaserzusammensetzung beeinflusste⁵²⁻⁵⁴. Auch Watt *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die hohe Niacinsupplementierung eine Erhöhung der mRNA-Konzentrationen von PPAR α , PPAR δ und PGC-1 α im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit einer bedarfsgerechten Niacinsupplementierung zur Folge hatte⁵¹. Die Ergebnisse aus einer Studie mit gesunden Ratten zeigten allerdings keine Niacin-induzierten Veränderungen der mRNA-Konzentrationen von PGC-1 α , PGC-1 β und PPAR δ ¹²⁴. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass eine hohe Niacinkonzentration unterschiedliche Auswirkungen auf einen gesunden bzw. einen kranken Organismus haben kann. Zuckerratten sind ein Modell, das Verwendung in der Simulation von Übergewicht und Insulinresistenz findet^{127,128}. Es ist daher möglich, dass in physiologisch funktionierenden Organismen, wie sie in der Studie von Scholz *et al.* (2014) oder auch in dieser Arbeit verwendet wurden, keine oder nur geringe Effekte durch Niacin, in Bezug auf einen verbesserten oxidativen Muskelphänotyp, hervorrufen¹²⁴.

Das Ergebnis, dass Ausdauertraining in Kombination mit einer hohen Niacinsupplementierung keinen zusätzlichen Nutzen hat, bzw. keine Interaktion vorliegt, ist auch in einer anderen Studie zu sehen. Dort konnte in der Niacingruppe, bei Durchführung eines zusätzlichen Trainings, keine weitere Steigerung der mRNA-Konzentrationen von PPAR α , PPAR δ und PGC-1 α induziert werden⁵¹.

Die relativen Proteinkonzentrationen von PGC-1 α geben auch keinen eindeutigen Hinweis, warum es bei Ausdauertraining alleine und vor allem bei Ausdauertraining und zusätzlicher Niacinsupplementierung zu einer verbesserten Ausdauerleistungsfähigkeit kommt. Im *M. gastrocnemius* hatte die hohe Niacinsupplementierung einen steigernden Einfluss auf die relative Proteinkonzentration von PGC-1 α , der aber durch zusätzliches Ausdauertraining gemindert wurde. Die Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung hatte hier dementsprechend einen gegenläufigen Effekt wie Ausdauertraining und adäquate Niacinsupplementierung.

Im *M. rectus femoris* wurde die relative Proteinkonzentration von PGC-1 α weder durch das Ausdauertraining, noch die hohe Niacinsupplementierung eindeutig verändert und auch eine Wechselwirkung von Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung liegt nicht vor.

Die Ergebnisse bezüglich der Wirkung einer hohen Niacinsupplementierung stehen nicht unbedingt im Einklang mit der gängigen Literatur. Aus dieser geht hervor, dass PGC-1 α durch Niacin erhöht werden kann⁵¹. PGC-1 α ist ein transkriptioneller Cofaktor, der eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren, die in verschiedenen biologischen Prozessen involviert sind, wie beispielsweise die Muskelfasertransformation oder den Fettsäuremetabolismus, reguliert⁷¹. Daher tritt der PGC-1 α vor allem in Muskeln, die einen hohen Gehalt an Typ I-Fasern enthalten, als Coaktivator auf^{72,129}. Die exakte Regulation des PGC-1 α auf die nachfolgende Kaskade, die in der Muskelfasertransformation resultiert, ist bisher nicht vollständig beschrieben.

Eine PGC-1 α -Aktivierung wird durch verschiedene Faktoren reguliert, dazugehörend auch steigende cAMP-Spiegel. Da im Rahmen von Ausdauertraining die AdrenalinKonzentrationen erhöht werden, welches seinerseits die PGC-1 α -Konzentrationen erhöht, kann die Regulation des PGC-1 α darüber ablaufen, dass Adrenalin an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet, woraufhin die

Adenylatcyclase aktiviert wird, die die cAMP-Konzentrationen steigen lässt¹³⁰. Nicht damit im Einklang steht jedoch, dass Niacin über eine Inhibierung der Adenylatcyclase zu verminderten cAMP-Konzentrationen führt^{28,131}.

Niacin führt außerdem über eine Phosphorylierung der p38 *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) zu deren Aktivierung und damit zu erhöhten PGC-1 α -Konzentrationen. Trotzdem ist dieser Effekt eher durch eine verbesserte Proteinstabilität, einhergehend mit einer erhöhten Halbwertszeit, zu erklären, anstatt durch eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors an sich. Das geht daraus hervor, dass eine *in vitro*-Induktion der p38 MAPK-Phosphorylierung nicht zu erhöhten PGC-1 α -mRNA-Konzentrationen führte^{51,132}.

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der durch Niacin induzierten Aktivierung von PGC-1 α ist, dass durch eine Niacin-Supplementierung mehr NAD⁺ zur Verfügung steht. Das NAD⁺-abhängige Sirt (Sirtuin) kann PGC-1 α vermehrt deacetylieren, wodurch dessen Konzentration erhöht wird³. Weiterhin ist im Zusammenhang mit Ausdauertraining bekannt, dass erhöhte NAD⁺-Konzentrationen im Rahmen von Ausdauertraining zu beobachten sind¹³³. Es konnte auch gezeigt werden, dass Niacin Einfluss auf die AMPK-Aktivierung hat, da es deren Phosphorylierung bewirkt und so deren Aktivität steigert¹³⁴. Die Aktivierung der AMPK ist ebenfalls assoziiert mit erhöhten NAD⁺-Konzentrationen und folglich mit einer erhöhten Sirt1-vermittelten PGC-1 α -Deacetylierung¹³⁵. In Bezug auf die Ausdauerleistungsfähigkeit konnten Narkar *et al.* (2008) zeigen, dass eine durch den AMPK-Agonist AICAR induzierte Aktivierung des PGC-1 α den Typ I-Faseranteil nicht erhöht und keine Auswirkung auf die Ausdauerleistung hat. Wird jedoch die AICAR-Gabe mit Ausdauertraining kombiniert, so resultiert dies in einem positiven Einfluss auf die Ausdauerleistungsfähigkeit und in einem erhöhten Anteil der Typ I-Muskelfasern¹³⁶. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass PGC-1 α nicht nötig ist, um die durch Ausdauertraining induzierte vermehrte Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung zu stimulieren¹²². Es ist also durchaus möglich, dass sowohl die verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit, ebenso wie die Induzierung eines erhöhten Typ I-Muskelfaseranteils zumindest nicht ausschließlich über PGC-1 α zu erklären ist. Wie die verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit bzw. der veränderte metabolische Phänotyp, gekennzeichnet durch eine erhöhte oxidative Phosphorylierung, mechanistisch von statten gehen, geht aus Literatur nicht eindeutig hervor und bleibt auch anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ungeklärt. Zu erwähnen ist auch, dass die

Datenlage bezüglich der AMPK-Aktivierung durch Niacin nicht ganz eindeutig ist. So konnten Watt *et al.* (2004) keine durch Niacin induzierte erhöhte AMPK-Aktivierung nachweisen⁷.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass in dieser Arbeit regelmäßiges Ausdauertraining nur einen sehr geringen Einfluss auf die Regulatoren der Muskelfasertransformation hat (Ausnahme im *M. rectus femoris* auf die mRNA-Konzentration von PPARGC1A), ebenso wie eine alleinige hohe Niacinsupplementierung (Ausnahme im *M. rectus femoris* auf die mRNA-Konzentration von PPARD). Weiterhin liegt keine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung in Bezug auf die Regulatoren der Muskelfasertransformation vor. Aufgrund der Ergebnisse der Ausdauerleistungsfähigkeit in der Gruppe mit der Kombination aus Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung waren diese Ergebnisse nicht zu erwarten, da das Ausdauerleistungsvermögen durch die Interaktion dieser beiden Behandlungen signifikant gesteigert werden konnte. Ein Grund für die oft nicht signifikanten, sondern nur numerisch veränderten Ergebnisse kann die große Streuung der Einzelwerte innerhalb der Gruppen bzw. generell die geringe Gruppengröße sein. Trotzdem ist zu schlussfolgern, dass die stark verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit durch eine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung über andere Wege ermöglicht wird, denen es auf den Grund zu gehen gilt.

Einfluss von Niacin und Ausdauertraining auf den oxidativen Muskelphänotyp

Einen weiteren Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit stellt der Fettsäuremetabolismus dar. Grund für diese Untersuchungen ist, dass PPAR δ und PGC-1 α und PGC-1 β als Schlüsselfaktoren des Muskelphänotyps maßgeblich Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus nehmen. Aus der Literatur ist bekannt, dass PPAR δ und PGC-1 α im Skelettmuskel als Hauptregulatoren von Genen der Fettsäureaufnahme in die Zelle, des intrazellulären Fettsäuretransports, des mitochondrialen Fettsäureimports, der mitochondrialen Fettsäureoxidation und der oxidativen Phosphorylierung fungieren^{74,77,107}. Fettsäuren und Fettsäuremetabolite (z.B. Acyl-CoA) sind Liganden der PPAR. Die Konzentration der Fettsäuren im Blut steigt während des Ausdauertrainings an und sinkt während der Regenerationsphase

anschließend wieder ab¹³⁷. Auch durch eine Niacinsupplementierung verändern sich die FFS-Konzentrationen im Blut. So liegen verminderte FFS-Konzentrationen initial nach einer Niacinsupplementierung vor, gefolgt von einem Anstieg im Zuge des *Rebound*-Effekts^{31,34,39,42}. Diese veränderten Konzentrationen von Fettsäuren könnten ein Stimulus für eine veränderte Aktivität der PPARs und folgend eine Induktion verschiedener Lipid-regulierender Gene darstellen⁵¹.

Ebenso ist bekannt, dass PPAR δ und PGC-1 α im Skelettmuskel die Mitochondrienbiogenese und Mitochondrienfunktion regulieren^{74,77,107}. PGC-1 β ist ähnlich wie PGC-1 α ein Schlüsselregulator des oxidativen Muskelphänotyps. Eine *Gain-of-function* des PGC-1 β im Skelettmuskel führt daher zu einer erhöhten Mitochondrienbiogenese und Expression mitochondrialer Proteine sowie einer verbesserten Mitochondrienaktivität⁷⁸. Dagegen bewirkt ein *knockout* des PGC-1 β ein vermindertes Mitochondrienvolumen, eine reduzierte Expression von Genen der Atmungskette und Atmungskettendefekte¹³⁸. Zudem konnte bei den transgenen Mäusen, die den PGC-1 β überexprimieren, eine Verschiebung des Faserverhältnisses zu den eher oxidativen Typ Ix-Fasern induziert werden, sodass es zu einer erhöhten Ausdauerleistungsfähigkeit kam⁷⁸.

Der Hypothese, dass Niacin Einfluss auf die Ausdauerleistungsfähigkeit und damit auch auf den Muskelphänotyp nimmt, wurde weiterhin dadurch nachgegangen, dass Gene, die an der Fettsäureverwertung beteiligt sind, untersucht wurden. Die mRNA-Konzentrationen der Gene der Fettsäureverwertung (*CPT1B*, *CACT*, *OCTN1*, *OCTN2*, *FATP* und *CD36*) und der β -Oxidation (*LCAD* und *MCAD*) wurden kaum durch das regelmäßige Ausdauertraining und die hohe Niacinsupplementierung verändert. Ebenso wenig lag eine Wechselwirkung zwischen den beiden Behandlungen vor.

Auch die Gene der Atmungskette (*COX4I1* und *COX6A2*) in der Muskulatur und des Tricarbonsäurezyklus (*SDHA*) in der Muskulatur waren in den Gruppen durch keine der Behandlungen eindeutig in eine Richtung verändert (Ausnahmen waren, dass das Ausdauertraining einen positiven Einfluss auf die mRNA-Konzentration von *COX4I1* im *M. gastrocnemius* hatte, während die hohe Niacinsupplementierung im *M. rectus femoris* einen mindernden Effekt auf die mRNA-Konzentrationen von *SDHA* hatte).

Diese Ergebnisse waren nicht zu erwarten, da eine verbesserte Leistungsfähigkeit in der Gruppe mit dem Ausdauertraining bzw. in der Gruppe mit dem Ausdauertraining und der hoher Niacinsupplementierung zu beobachten war. Die Ergebnisse der Messung der mRNA-Konzentrationen von Genen des Fettsäure-Metabolismus stehen zwar im Widerspruch mit eingangs beschriebener Literatur, jedoch ist die Datenlage um den Einfluss der Schlüsselfaktoren PPAR δ und PGC-1 α auf den Fettsäure-Metabolismus durchaus heterogen. So konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Expression der Hauptregulatoren des Fettsäure-Metabolismus (*PPAR α* , *PPAR δ* und *PGC-1 α*) keine Veränderungen im Fettsäure-Metabolismus nach sich zieht. So zeigten sich auch dort, obwohl die mRNA-Konzentrationen von PPAR α , PPAR δ und PGC-1 α erhöht waren, keine Veränderungen der mRNA-Konzentrationen der CD36, der CPT1 und der HSL in der Trainings- oder Niacingruppe. In der Niacingruppe konnten allerdings nach einem zusätzlichen Training erhöhte mRNA-Konzentrationen von CD36 gefunden werden⁵¹.

Wirkung von Niacin und Ausdauertraining auf die Angiogenese

PGC-1 α ist nicht nur bekannt als Regulator des Fettsäurestoffwechsels, sondern er reguliert auch VEGFA und VEGFB^{79,80}. Diese Wachstumsfaktoren sind verantwortlich für die Angiogenese und die Vaskularisierung u.a. in der Muskulatur. In Typ I-Fasern liegt daher eine höhere Expression der angiogenen Faktoren vor, da sie an einer verbesserten Substratversorgung des Muskels mit Sauerstoff und Fettsäuren beteiligt sind^{79,140}. In diesem Zusammenhang konnte in anderen Studien durch eine Niacinsupplementierung eine erhöhte Expression des PGC-1 α zusammen mit erhöhten mRNA-Konzentrationen von VEGFA und VEGFB beobachtet werden^{52,53}. Ebenso ist die Angiogenese eine Adaption bei Ausdauertraining⁸¹. Demzufolge wurden in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Konzentrationen von VEGFA und VEGFB in der Muskulatur untersucht. Hier zeigte sich, dass durch die hohe Niacinsupplementierung im *M. rectus femoris* die mRNA-Konzentrationen des VEGFA erhöht, im *M. gastrocnemius* jedoch durch dieselbe Behandlung erniedrigt waren. Die mRNA-Konzentration von VEGFB wurde in beiden Muskeln nicht beeinflusst. Auch Scholz *et al.* (2014), die gesunden Ratten eine pharmakologische Niacinsupplementierung verabreichten, konnten keine Niacin-induzierten Veränderungen der mRNA-Konzentrationen des VEGFA und VEGFB zeigen¹²⁴.

Einfluss von Niacin und Ausdauertraining auf den Carnitinstoffwechsel

Ein weiterer Bereich, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde und eng mit dem Muskelphänotyp verknüpft ist, ist der Carnitinstoffwechsel. Laut einer vorangegangenen Studie hat eine Niacinsupplementierung Einfluss auf die Carnitinkonzentration, dessen Vorstufen und Metaboliten⁸³. Die β -Oxidation der Fettsäuren wird stark durch Carnitin reguliert, da die langkettigen Fettsäuren (LKFS) nur Carnitin-gebunden, in Form von Acyl-Carnitin, in die innere Mitochondrienmembran gelangen können, wo sie letztendlich oxidiert werden^{141,142}. In übergewichtigen Ratten konnte gezeigt werden, dass der durch Übergewicht beeinträchtigte Carnitinstatus mithilfe einer Niacingabe verbessert werden kann⁸³. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von Carnitin und dessen Vorstufen (Trimethyllysin und γ -Butyrobetain) im Plasma durch eine hohe Niacinsupplementierung jedoch nicht beeinflusst. In der Leber hatte die hohe Niacinsupplementierung einen positiven Einfluss auf die Konzentrationen des Gesamtcarnitins und des freien Carnitins und tendenziell einen positiven Einfluss auf die Konzentration des Acetyl-Carnitins. Das Ausdauertraining hatte keinen Effekt auf die Konzentrationen der Carnitinparameter, ebenso lag keine Interaktion zwischen hoher Niacinsupplementierung und Ausdauertraining vor. Eine Erklärung dafür, dass nicht stärkere Effekte zu beobachten sind, ist, dass sich bei gesunden Tieren die Carnitinkonzentrationen schon im physiologischen Rahmen bewegen und sich daher nicht weiter verändern.

Wirkung von Niacin und Ausdauertraining auf ausgewählte Plasmalipidparameter

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit der etablierte lipidsenkende Effekt von Niacin nicht bestätigt werden^{13,14}. Durch die hohe Niacinsupplementierung waren weder die TG- noch die FFS-Konzentrationen erniedrigt. Der nicht-vorhandene Einfluss des Niacins ist jedoch nicht auf eine ungenügend hohe Konzentration im Futter zurückzuführen. Abgesichert wird eine ausreichend hohe Niacin-Konzentration im Futter dadurch, dass das Futter mit der hohen Niacinsupplementierung die Plasma-NAM-Konzentrationen um das sechsfache erhöhte. Dies lässt auf eine

ausreichend hohe Bioverfügbarkeit des Niacins in der Ration schließen. Eine Vermutung, warum Niacin auch hier keinen Effekt auf die Plasmalipidparameter hat, ist, dass diese bei den gesunden Mäusen in einem physiologischen Bereich lagen und daher nicht weiter abgesenkt werden konnten. Ebenso konnte bei gesunden Menschen, Schweinen und gesunden Ratten kein Effekt von Niacin auf die TG-Konzentrationen gezeigt werden^{32,54,124}. Auch die FFS-Konzentrationen wurden bei gesunden Ratten, Schafen und Schweinen durch eine Niacinsupplementierung nicht beeinflusst. In Bezug auf die FFS ist eine weitere mögliche Erklärung der sogenannte *Rebound*-Effekt des Niacins, der die initial verminderte Lipolyse verdeckt^{31,34,143}.

Auswirkung von Niacin und Ausdauertraining auf den Fettsäuremetabolismus der Leber

Auch die Leber spielt eine zentrale Rolle im Fettsäuremetabolismus. Daher wurden in der hier vorliegenden Arbeit auch mRNA-Konzentrationen des Fettsäuremetabolismus in der Leber untersucht. Es zeigte sich, dass in der Leber die mRNA-Konzentrationen der Gene der Lipogenese (*ACACA*, *FASN*, *GPAT* und *SREBP1c*) in der Varianzanalyse signifikant (*ACACA* und *SREBP1c*) bzw. tendenziell (*FASN* und *GPAT*) durch die Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung gemindert waren. Die mRNA-Konzentrationen von *FASN* und *GPAT* waren ebenso durch die hohe Niacinsupplementierung tendenziell gemindert. Eine mögliche Erklärung für eine verminderte Lipogenese ist die Wirkung von Niacin auf die AMPK, die aus der Literatur bekannt ist. Niacin erhöht die AMPK-Aktivierung durch dessen Phosphorylierung¹³⁴. Eine AMPK-Aktivierung vermittelt wiederum eine verminderte Lipogenese durch Inhibierung von *SREBP1c*, *FAS* und *ACC*^{131,131,139}. Die Effekte in der vorliegenden Arbeit sind jedoch nur marginal. Da auch in der Muskulatur kaum ein Einfluss der hohen Niacinsupplementierung auf den Fettsäure-Stoffwechsel beobachtet wurde, stehen diese beiden Ergebnisse im Einklang. Aufgrund dessen, dass im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel keine grundlegenden Veränderungen zu beobachten waren, die die beobachtete Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit erklären würden, wurde weitergehend auch der Kohlenhydratstoffwechsel untersucht.

Einfluss von Niacin und Ausdauertraining auf den Kohlenhydratmetabolismus in der Muskulatur

Im Hinblick auf Ausdauertraining sind die Energiequellen, die vom Muskel benutzt werden, stark von der Dauer und der Intensität des Trainings abhängig. Vereinfacht lässt sich sagen, dass bei einer kurzen Dauer eher Kohlenhydrate verwertet werden, bei einer längeren Dauer eher Fettsäuren^{60,65,144}. Bei der Intensität verhält es sich genau anders herum. Hier werden bei niedriger Intensität eher Fettsäuren benutzt, bei hoher Intensität eher Kohlenhydrate^{145,146}. Natürlich ist nicht nur die Oxidation von Fettsäuren maßgeblich für die Ausdauerleistungsfähigkeit. Auch Glycogen, als Speicherform der Glucose, stellt eine weitere Energiequelle dar. Glycogenspeicher sind sowohl in der Leber als auch in der Muskulatur zu finden, wobei die Glykogenspeicher in der Muskulatur den Großteil des Gesamtkörper-Glycogens ausmachen¹⁴⁶. Stehen Fettsäuren bei niedrigen Intensitäten nicht zur Verfügung, so werden vermehrt Kohlenhydrate benutzt. Das konnten Howlett *et al.* (2001) eindrucksvoll dadurch demonstrieren, dass moderates Ausdauertraining bei untrainierten Individuen, die vermittelt durch eine Niacin-Gabe eine verminderte FFS-Konzentrationen aufwiesen, dazu führte, dass der Anteil der Kohlenhydratoxidation zur Energiebereitstellung erhöht wurde, da nicht ausreichend FFS vorlagen¹⁴⁷.

In dieser Arbeit wurde das Ausdauertraining bei 80 % der VO_2max durchgeführt. Das entspricht einer intensiven Trainingsintensität¹¹¹. Vor dem Hintergrund, dass bei dieser Intensität eher der Kohlenhydratmetabolismus genutzt wird, um Energie bereitzustellen, wurden im Weiteren die Effekte von Niacin und Ausdauertraining auf die Glykolyse, Glycogenolyse und Glycogensynthese untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch regelmäßiges Ausdauertraining die mRNA-Konzentrationen im *M. gastrocnemius* von PYGM positiv beeinflusst werden konnte, für die mRNA-Konzentration von GYS1 die Tendenz hinsichtlich einer Erhöhung vorlag. Im *M. rectus femoris* war ebenso ein tendenzieller Einfluss des Ausdauertrainings auf erhöhte mRNA-Konzentrationen von PHKA1 zu beobachten. Stärker war jedoch der Effekt der hohen Niacinsupplementierung. Im *M. gastrocnemius* beeinflusste die hohe Niacinsupplementierung die mRNA-Konzentrationen von GAPDH, PFKM, PHKA1, PYGM und GYS1 positiv. Im *M. rectus femoris* waren die Effekte ähnlich stark. Hier waren durch die hohe

Niacinsupplementierung die mRNA-Konzentrationen von GAPDH, PHKA1, PYGM und GYS1 erhöht. Die Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung hatte nur im *M. gastrocnemius* einen erhöhenden Effekt auf die mRNA-Konzentration von PYGM. Die starke Verbesserung der Ausdauerleistung in der Gruppe, die die hohe Niacinsupplementierung und das Ausdauertraining bekamen, kann also nicht durch eine Änderung des Kohlenhydratmetabolismus erklärt werden. Eine signifikant erhöhte Expression von Genen im Kohlenhydratmetabolismus durch das Ausdauertraining induziert, ist nur in sehr geringem Ausmaß zu beobachten. Da bei einer Intensität von 80 % VO_2max trainiert wurde, wodurch auch schon der glykolytische Stoffwechsel und nicht nur der oxidative Stoffwechsel angesprochen wird, sind die Adaptionen nur teilweise passend zur gängigen Literatur^{60,81}. Ebenso stehen die durch die hohe Niacinsupplementierung erhöhten mRNA-Konzentrationen dieser Gene nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Testung des Ausdauervermögens, da durch die hohe Niacinsupplementierung die Ausdauerleistungsfähigkeit nicht beeinflusst wurde. Dass die hohe Niacinsupplementierung Einfluss auf die Gene des Kohlenhydratmetabolismus hat, war in dem Ausmaß nicht zu erwarten, ist aber durchaus mit Befunden aus der Literatur zu erklären, auf die im Folgenden weiter eingegangen wird.

Beim Menschen ist der Glycogenspeicher in der Muskulatur limitierend für die Ausdauerleistungsfähigkeit¹⁴⁸. Die Glycogensynthese spielt bei der Bildung der Glycogenspeicher eine maßgebliche Rolle, da sie das Schlüsselenzym der Glycogensynthese ist. Die Glycogensynthese hat sowohl eine hepatische, als auch eine muskuläre Isoform. Reguliert werden diese Isoformen unter anderem durch die AMPK, deren Aktivität durch Ausdauertraining erhöht werden kann^{149,150}. Die AMPK γ 3-Untereinheit ist eine der Untereinheiten der AMPK und spezifisch für die Muskulatur. Es konnte gezeigt werden, dass die Skelettmuskulatur von AMPK γ 3 *knockout* Mäusen bei einem intensiven Ausdauertraining schneller ermüdet¹⁵⁰ und die Glycogensynthese in der Regenerationsphase vermindert ist^{150,151}. Diese Studien zeigen die Bedeutsamkeit der AMPK in der Glycogensynthese und die Bedeutsamkeit der Glycogensynthese für die Ermüdungsresistenz und die Regeneration. Auch in einer Studie an Ratten, die Ausdauertraining unterzogen wurden, konnte gezeigt werden, dass die Glycogenspeicher der Muskulatur größer sind, als bei nicht trainierten Ratten¹⁴⁹. Ein maximales Füllen der Glycogenspeicher

geschieht über die Glycogen-Superkompensation. Das heißt, dass der Glycogengehalt in der Muskulatur in den Tagen vor der Belastung zunächst durch intensives Training geleert wird und dann durch eine hohe Kohlenhydratzufuhr wieder über das Ausgangsniveau gefüllt wird. Einerseits erfolgt die Superkompensation durch einen erhöhten Glucosetransport in den Muskel via *Glucose transporter type 4* (GLUT-4), andererseits aber auch durch eine gesteigerte Aktivität der Glycogensynthase^{150,152}.

Für die Verfügbarkeit der Glycogenspeicher ist aber nicht nur der Glycogenaufbau von Bedeutung, sondern auch der Glycogenabbau. In der Leber und in der Muskulatur kann die Glycogenolyse stattfinden, um Glucose bereitzustellen. Dabei wird vom Glycogen durch die Glycogenphosphorylase mit Hilfe des Coenzym Pyridoxalphosphat je ein Molekül Glucose abgespalten, welches dann als Glucose-1-Phosphat vorliegt und weiter in Glucose-6-Phosphat umgewandelt wird. Vom Glucose-6-Phosphat wird in der Leber der Phosphatrest durch die Glucose-6-Phosphatase abgespalten und die Glucose kann ins Blut abgegeben werden. In der Muskulatur hingegen fehlt dieses Enzym. Hier wird Glucose-6-Phosphat unter Energiegewinnung in die Glykolyse eingeschleust¹⁵³. Wie schon erwähnt ist festzustellen, dass mit zunehmender Belastungsdauer weniger Fettsäuren oxidiert werden und die aerobe Glykolyse an Bedeutung gewinnt. Bei sehr langen Belastungen reicht die Glykolyse jedoch nicht aus, um den Energiebedarf zu decken. Hier kommen nun die Fettsäuren ins Spiel, die einen immer größeren Teil der benötigten Energie bereitstellen⁶⁰. Da aus Glycogen pro Liter eingeatmetem Sauerstoff mehr Energie, in Form von ATP, gewonnen werden kann als aus Fettsäuren und zudem die Energie schneller verfügbar ist, sind für Ausdauersportler die Größe und die Verfügbarkeit der Glycogenspeicher von enormer Bedeutung¹⁵⁴. Das Ziel eines Ausdauersportlers ist es daher, die Energiebereitstellung aus den Glycogenspeichern so lange wie möglich aufrecht zu erhalten^{60,155}.

Die Arbeit von Quinlan *et al.* (2010) die sich mit einem Polymorphismus des *ACTN*-Gens beschäftigt, zeigt die Bedeutung des Glycogenabbaus für die Energiebereitstellung beim Sport¹⁵⁵. Actinine sind Actin-bindende Proteine und werden durch das *ACTN*-Gen codiert. Die *ACTN3*-Isoform kommt dabei ausschließlich in *Fast-twitch*-Muskel Fasern vor. Ein Polymorphismus im *ACTN3*-Gen führt zu einem kompletten Mangel des *Fast-twitch* Faserproteins α -Actinin-3¹⁵⁶. Dieser Mangel ist assoziiert mit einer verbesserten Ausdauerleistung beim

Menschen¹⁵⁷. Mäuse mit einem *knockout* des ACTN3 zeigen eine verminderte Anzahl der Typ II-Fasern und eine vermehrte Anzahl der Typ I-Fasern, einhergehend mit einer erhöhten Aktivität von Enzymen des aeroben Metabolismus und langsameren kontraktilen Proteinen. Vom α -Actinin-3 ist bekannt, dass es weiterhin die Bildung bestimmter Proteine im Muskel reguliert. Die Glycogenphosphorylase, die maßgeblich für die Glycogenolyse verantwortlich ist, ist eines davon und zeigte bei den ACTN3-*knockout*-Mäusen eine verminderte Aktivität. Dadurch waren bei den ACTN3-*knockout*-Mäusen ein erhöhter Glycogengehalt in der Muskulatur und eine verminderte Kapazität, Glycogen als Energiequelle zu verwenden, zu beobachten. Dabei wurde gleichzeitig verfrüht auf eine gesteigerte Fettsäureoxidation zurückgegriffen¹⁵⁵, was den Leistungsvorteil in der Ausdauerfähigkeit beim Menschen erklären würde. Anhand dieser Studie kann die Bedeutung der Glycogenspeicher und deren Regulation demonstriert werden.

In dieser Arbeit waren keine durchgehend signifikanten Effekte von Ausdauertraining auf den Kohlenhydratmetabolismus nachweisbar. Ebenso konnte die Bedeutsamkeit der Größe der Glycogenspeicher für die Ausdauerleistungsfähigkeit nicht gezeigt werden. Die Glycogenkonzentrationen in der Leber und in den Muskeln (*M. gastrocnemius* und *M. rectus femoris*) unterschieden sich nicht signifikant im Vergleich zwischen den Gruppen. Es gibt jedoch Hinweise aus der Literatur, die eine Erklärung für die nicht veränderten Glycogenspeicher ermöglichen.

So zeigten Watt *et al.* (2004), dass eine verbesserte Leistungsfähigkeit durch eine Niacingabe keinen Einfluss auf die Glycogenspeicher hat. Vielmehr führen die Autoren den leistungsverbessernden Effekt auf eine vermehrte Benutzung der IMTG zurück⁵¹. Auch andere Beispiele aus der Literatur zeigen, dass die Glycogenspeicher beim Nager keine zentrale Rolle für die Ausdauerleistungsfähigkeit haben. Bei einem Mausmodell, bei dem die Bildung der muskulären Glycogensynthese gestört ist und dem Muskel jegliche Glycogenspeicher fehlen, konnte kein Nachteil in einem Ausdauerstest bis hin zur Erschöpfung festgestellt werden¹⁵⁸. Und auch Mäuse, bei denen eine Überexpression der muskulären Glycogensynthese induziert wurde und die Glycogenspeicher der Muskulatur dadurch größer waren, zeigten keine verbesserte Leistungsfähigkeit¹⁵⁹. Pederson *et al.* (2005) schlussfolgerten daher, dass bei Mäusen die Glycogenspeicher in der Leber eventuell eine größeren Rolle spielen als die in der Muskulatur, ganz im Gegensatz zum Menschen¹⁵⁹.

Bleibt zu klären, wodurch Niacin Einfluss auf den Kohlenhydratmetabolismus nimmt. Durch eine Niacingabe werden die Serum-Glucosekonzentrationen erhöht. Das geht wahrscheinlich auf eine verminderte Insulinsensitivität zurück¹⁹. Der weiter oben beschriebene *Rebound*-Effekt der FFS, welcher auf eine initiale Minderung der FFS-Konzentrationen durch eine Niacingabe folgt, ist dabei eine mögliche Erklärung für die verminderte Insulinsensitivität. Die durch den *Rebound*-Effekt erhöhten FFS-Konzentrationen verschlechtern den Glucosemetabolismus und fördern so die Insulinresistenz¹⁶⁰.

Eine weitere Möglichkeit des Niacins Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel zu nehmen, ist über die Niacin-induzierte Phosphorylierung der AMPK, wodurch deren Aktivität gesteigert wird¹³⁴. Die aktivierte AMPK kann unter anderem die Expression des GLUT-4 steigern¹⁶¹. Eine Folge der gesteigerten AMPK-Aktivität ist die vermehrte Expression von GLUT-4¹⁶¹. In einer Zellstudie konnte gezeigt werden, dass Niacin zudem in der Lage ist, die mRNA-Konzentration von GAPDH und Glucose-6-Phosphatase zu steigern¹⁶². Eine durch Ausdauertraining induzierte AMPK ist ferner in der Lage die Konzentration der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK)4 zu erhöhen, wodurch die Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität gemindert und in Folge dessen die Glucoseoxidation vermindert wird¹⁶³. Daher besteht die Möglichkeit, dass auch Niacin diese Effekte vermittelt, da die AMPK-Aktivität auch durch Niacin erhöht werden kann. Die AMPK-Aktivierung, die während Ausdauertraining auftritt^{164,165}, ist involviert in verschiedene metabolische Veränderungen, wie beispielsweise eine erhöhte Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel^{164,166} und eine gesteigerte Glykolyse¹⁶⁷, aber auch eine gesteigerte Fettsäureoxidation^{168,169}. Da sowohl Niacin als auch Ausdauertraining die AMPK-Aktivierung hervorrufen kann, die sowohl an der Regulation des Fettsäurestoffwechsels als auch des Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt ist, ist davon auszugehen, dass auch andere Stoffwechselwege über weitere Regulatoren aktiviert werden, die auf den ersten Blick gegensätzlich erscheinen.

Eine weitere Verknüpfung zwischen Niacin und dem Kohlenhydratmetabolismus ist die Glucoseabsorption. Es konnte gezeigt werden, dass sich ein Niacinmangel vermindern auf die jejunale Glucoseabsorption auswirkt^{170,171}. Es ist daher möglich,

dass eine Niacingabe die jejunale Glucoseabsorption steigert. Dafür sprechen würde, dass bei diabetischen Mäusen eine erhöhte Expression des jejunalen GRP109a zu finden ist, was in einer gesteigerten Glucoseaufnahme resultiert¹⁷². Unter normalen Umständen sind erhöhte Glucosekonzentrationen im Blut nicht unbedingt wünschenswert, da sie mit einer induzierten Glucoseintoleranz vergesellschaftet werden. In zahlreichen Studien konnte beobachtet werden, dass eine Niacin-Supplementierung die Insulinsensitivität verschlechtert, was sich negativ auf die Entwicklung eines Diabetes auswirken kann^{41,118,173}. Verantwortlich für die Glucose-Absorption in den Skelettmuskel ist der insulinabhängige Transporter GLUT-4. In einer Zellstudie konnte die Bindung von Niacin an den GRP109a die Aktivität der PKC erhöhen¹³¹, die notwendig für die Translokation von GLUT-4-Vesikeln an die Zelloberfläche ist, was die gesteigerte Glucoseaufnahme erklären würde¹⁷⁴. Auch der Coaktivator PGC-1 α , der durch Niacin induziert werden kann, vermittelt eine vermehrte Genexpression von *GLUT-4* im Skelettmuskel¹⁷⁵.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit im Bereich des Kohlenhydratstoffwechsels, dass vor allem die hohe Niacinsupplementierung zu erhöhten mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus führt. Ein Effekt von Ausdauertraining oder eine Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung kann nur im Einzelfall nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus der Testung des Ausdauerleistungsvermögens, mit keinem Einfluss der hohen Niacinsupplementierung, aber dafür einer starken Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung spiegeln sich daher nicht in den Ergebnissen der mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus wider, wo die erhöhenden Effekte vor allem durch die hohe Niacinsupplementierung hervorgerufen wurden. Anhand dieser Ergebnisse ist abzuleiten, dass das verbesserte Ausdauerleistungsvermögen, was durch die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung entsteht, nicht auf Basis eines veränderten Kohlenhydratmetabolismus zu erklären ist. Ebenso haben die durch hohe Niacinsupplementierung veränderten mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus keinen Einfluss auf das Ausdauerleistungsvermögen.

Mögliche Wirkung von Niacin als Vorstufe des Coenzym NAD auf die Ausdauerleistungsfähigkeit

Obwohl die Coenzymfunktion des Niacins nicht für den lipidsenkenden Effekt verantwortlich ist²³, so besteht die Möglichkeit, dass die Coenzymfunktion sehr wohl Einflüsse auf die Ausdauerleistungsfähigkeit hat. Wie in der Einleitung erwähnt, nimmt die Verabreichung von Niacin, ob als einmalige hohe Gabe oder als kontinuierliche Verabreichung, einen erheblichen Einfluss auf die Verstoffwechslung des Niacins. In dieser Arbeit wurde die Niacinmenge nicht anhand einer einmaligen täglichen Gabe verabreicht, sondern sie wurde anhand des Futters kontinuierlich von den Mäusen aufgenommen. Diese Darreichungsform beinhaltet eine Verstoffwechslung, die durch eine geringe Affinität, aber hohe Kapazität gekennzeichnet ist (siehe Abbildung 1.3), wodurch es zur Bildung von NAM und darauf folgend zu NAD oder anderen Metaboliten (6-HN, NNO, N-Methyl-NAM, 2PY, 4PY) kommt^{14,41,49,50}.

NAD spielt eine wichtige Rolle bei der ATP-Synthese. Aufgrund dessen, dass Niacin eine der Vorstufen von NAD ist, ist zu vermuten, dass sich eine Niacinsupplementierung positiv auf das Ausdauervermögen auswirkt^{60,167,176}. Beim Ausdauertraining wird ATP verbraucht und demzufolge ist ATP notwendig, um die Ausdauerleistungsfähigkeit aufrecht zu erhalten. ATP entsteht aus ADP und organischem Phosphat in der Atmungskette, unter anderem unter Verbrauch von NADH und Entstehung von NAD. Es konnte gezeigt werden, dass durch Training die Metaboliten des Tricarbonsäure-Zyklus um bis das 10-fache gesteigert sind¹⁷⁷. Der *Turnover* von NAD ist dadurch enorm erhöht, was mit einem gesteigerten NAD-Abbau einhergeht. Diese These kann dadurch gestützt werden, dass nach Ausdauertraining verminderte NAD-Konzentrationen im Plasma zu finden sind¹⁷⁷. Eine Erklärung für die verringerten NAD-Konzentrationen nach dem Training könnte die gesteigerte Aktivität der Nikotinamid N-Methyltransferase (NNMT) sein, die die Reaktion von NAM und SAM zu MNA und SAH katalysiert, also den Abbau von NAM. Das NAM kommt dabei aus dem Abbau des NAD (katalysiert durch die Glycohydrolase)¹⁷⁸. Chlopicki *et al.* (2012) konnten zeigen, dass durch ein einzelnes intensives Training die Aktivität der NNMT gesteigert werden kann, einhergehend mit einer erhöhten Konzentration von 1-Methyl-NAM, 2PY und 4PY (siehe Abb 1.3)¹⁷⁹. Ist die Aktivität der NNMT gesteigert, so wird die Verfügbarkeit von NAD für die NADH-Synthese gemindert, einhergehend mit einer Inhibierung des Komplex I der

Atmungskette, was in einer verminderten ATP-Synthese resultiert¹⁷⁸. Die ATP-Synthese ist jedoch wichtig für die Aufrechterhaltung der Leistung^{60,167,176}. Bringt man diese Datenlage in Zusammenhang mit Studien, die sich mit einer NAM-Gabe beschäftigen, ergibt sich ein interessantes Bild. So konnte gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Injektion von NAM während des Ausdauertrainings zum einen in einer Steigerung der Plasma-NAD-Konzentration resultiert, zum anderen in einer verzögerten Zeit bis zur Erschöpfung. Die NAD-Konzentration ist damit einer der limitierenden Faktoren für die Aufrechterhaltung der Ausdauerleistung¹⁷⁷. Da NAM im Gegensatz zu Niacin keine lipidsenkende Wirkung hat, muss davon ausgegangen werden, dass hier NAM als Vorstufe von NAD wirkt und somit seine Coenzymfunktion den leistungssteigernden Effekt hervorrufen kann.

Eine weitere mögliche Erklärung der Wirkung von Niacin als Vorstufe des Coenzym NAD auf die Ausdauerleistungsfähigkeit gibt eine Studie an Mäusen. Hier konnte demonstriert werden, dass durch eine NAM-reiche Diät die Ausdauer der Mäuse verbessert wurde¹⁸⁰. Wie schon erwähnt, ist nicht nur Niacin sondern auch NAM eine Vorstufe von NAD¹. Sokhodub *et al.* (2011) gehen von einem Einfluss einer NAM-reichen Diät auf die Ausdauerfähigkeit aus, die über den *sulfonylurea receptor* (SUR)2A vermittelt wird. In dieser Studie war bei Mäusen, die eine NAM-reiche Diät bekamen, die Expression des SUR2A-Rezeptors signifikant erhöht¹⁸⁰. SUR2A ist ein ATP-bindendes Protein, das als regulatorische Untereinheit der kardioprotektiven ATP-sensitiven K^+ (K_{ATP})-Kanäle in Kardiomyozyten und der Skelettmuskulatur vorkommt. Diese Rezeptoren regulieren die Kalzium-Homöostase der Zellen und schützen sie vor einem übermäßigen Kalziumeinstrom. Außerdem messen sie die ADP/ATP-Relation und verbinden so die Erregbarkeit der Zelle mit ihrem energetischen Status¹⁸¹. Wie genau der Zusammenhang zwischen NAM und den K^+ (K_{ATP})-Kanälen zu Stande kommt, ist unklar. Andersherum konnte hingegen gezeigt werden, dass ein Mangel dieser Kanäle die Ausdauerleistung vermindert¹⁸⁰.

Wie anhand der Ergebnisse dieser Arbeit zu erkennen ist, hat die hohe Niacin-supplementierung einen großen Einfluss auf die NAM-Konzentrationen im Plasma der Mäuse. Diese sind im Vergleich mit den Gruppen, die Niacin im bedarfsdeckenden Mengen bekamen, um das sechsfache erhöht. Dadurch ist ein Einfluss des NAM, und vor allem eine Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung, auf die Ausdauerleistungsfähigkeit in Betracht zu ziehen.

Niacin und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) als Substrat für Sirtuine

Vor dem Hintergrund, dass Niacin als Substrat für NAD verfügbar ist, sollte auch ein Blick auf die Sirtuine geworfen werden. NAD fungiert als Substrat für die SIRTs, sodass SIRT-abhängige Histon-Deacetylierungen und die Modulation anderer Proteine ablaufen können. Wie schon beschrieben entsteht während dieser Reaktionen NAM. Da NAM die SIRT-Aktivität hemmt, wird es über den NAD *Salvage pathway* wieder in NAD umgewandelt. Das Schlüsselenzym des NAD *Salvage pathway* ist die Nikotinamid-Phosphoribosyl-Transferase (NAMPT)¹⁸². Es konnte gezeigt werden, dass Ausdauertraining bei Mäusen mit einer Erhöhung der SIRT1-Aktivierung einhergeht¹⁸³. Gleichzeitig liegen erhöhte Proteinkonzentrationen von NAMPT vor, was in einer erhöhten NAD-Konzentration resultiert. Dadurch wird sichergestellt, dass das Sirtuin-Substrat NAD ausreichend bereitgestellt wird⁴. Auch ATP spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle, da dieses im Rahmen von Training verbraucht wird und die SIRT1-Aktivierung induzieren kann. Durch den ATP-Verbrauch steigen die AMP-Konzentrationen, während die ATP-Konzentrationen fallen, wodurch die AMPK aktiviert wird. Die aktivierte AMPK phosphoryliert die NAMPT, die daraufhin im aktivierten Zustand vorliegt. Durch die NAMPT-Aktivierung werden im Folgenden die intrazellulären NAD-Konzentrationen angehoben, wodurch ausreichend NAD als Substrat für SIRT1 vorhanden ist und SIRT1 dadurch aktiviert vorliegt¹⁸⁴. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine akute Trainingseinheit direkten Einfluss auf die NAMPT-Proteinexpression hat. Dieses Geschehen ist unter anderem von einem AMPK-Heterotrimer mit einer funktionierenden katalytischen $\alpha 2$ -Untereinheit abhängig^{184,185}. Ein AMPK-Mangel hingegen beeinträchtigt die SIRT-abhängigen Adaptionen, welche normalerweise auf Ausdauertraining folgen¹⁸⁴. Inhaltlich lassen sich diese Prozesse darauf reduzieren, dass es bei einem Verbrauch von NAD im Rahmen von Ausdauertraining über die Aktivierung der NAMPT wieder zu einer Anhebung der NAD-Konzentrationen kommt, die wichtig für die Sirtuine ist. Hypothetisch beinhaltet die gleichzeitige Behandlung aus Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung, wie in in der vorliegenden Arbeit, gleich mehrere Effekte. Zum einen führt die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung zu einer ausreichenden Versorgung mit Niacin da es Vorstufe des NAD ist. Zum anderen induziert das Ausdauertraining eine erhöhte Aktivität der Enzyme, die notwendig sind für

Adaptionen, die auf das Ausdauertraining hin folgen. Diese beiden Effekte oder auch die Interaktion können also durchaus als Erklärung der stark verbesserten Ausdauerleistungsfähigkeit in der Gruppe mit der Kombination aus Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung in Betracht gezogen werden.

Einfluss von Niacin und NAM auf die Entstehung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies im Hinblick auf die Ausdauerleistungsfähigkeit

Ausdauertraining induziert eine erhöhte Substratverwertung in den arbeitenden Muskeln, wodurch ein erhöhter Verbrauch von Sauerstoff vorliegt. Der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, kombiniert mit einer Aktivierung bestimmter metabolischer Wege, resultiert in einer gesteigerten Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)^{186,187}. Zu den ROS gehören Superoxid, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid und Hydroxyle^{188,189}. ROS entstehen dadurch, dass die Enzyme der Atmungskette in den Mitochondrien in ihrer Aktivität erhöht sind, um eine ausreichende ATP-Produktion sicherzustellen. ROS entstehen daher natürlicherweise durch oxidative Prozesse und sind hoch reaktiv. Daher gibt es endogene und exogene Abwehrmechanismen, die die ROS abfangen, sodass dem Organismus kein Schaden zugefügt wird. Zu den endogenen Abwehrmechanismen gehören die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathionperoxidase (GPx)¹⁹⁰. Ein Ungleichgewicht zwischen der ROS-Produktion und dem antioxidativen Abwehrsystem ruft übermäßigen oxidativen Stress hervor, den es zu vermeiden gilt^{188,190}. ROS im physiologischen Rahmen sind jedoch für eine Adaption des Muskels und des Metabolismus im Muskel an Ausdauertraining wichtig¹⁹¹. So spielen ROS eine wichtige Rolle als Modulatoren für die Muskelkontraktion, den antioxidativen Schutz und die Reparatur oxidativer Schäden. Im physiologischen Rahmen ist eine ROS-Produktion daher wünschenswert, damit die Trainings-induzierten Adaptionen ablaufen können¹⁹²⁻¹⁹⁴. Eine Steigerung der Mitochondrienanzahl ist eine dieser Adaptionen. Durch die erhöhte Mitochondrienanzahl wird sichergestellt, dass eine geringe Atmungskettenaktivität bei gleichzeitig hoher ATP-Synthese gewährleistet werden kann, wodurch die ROS-Produktion niedrig gehalten wird¹⁸⁷. Weiterhin ist die Aktivität antioxidativer Enzyme gesteigert. Zu ihnen gehören die GPx und die Peroxiredoxine (PRDx), die die NAD-

abhängige Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser katalysieren. Bei diesen Reaktionen wird aus Glutathion (GSH) Glutathiondisulfid und aus Thioredoxin Thioredoxindisulfid. Um die Disulfide wieder in den reduzierten Zustand zu überführen sind Reaktionen, die von der Glutathionreduktase bzw. Thioredoxinreduktase katalysiert werden, nötig. Diese Reaktionen sind NADPH-abhängig. Daher sind Niacin und NAM als Vorstufen von NAD und damit auch von NADPH essentiell für ein Funktionieren dieses Entgiftungsvorganges der ROS. In den meisten Geweben wird NADPH über den Pentosephosphatweg mittels der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) bereitgestellt. In der Muskulatur hingegen wird NADP vor allem über die Isocitrat-Dehydrogenase produziert. Die Menge an GPx im Muskel ist unterschiedlich. Oxidative Muskelfasern besitzen hohe GPx-Konzentrationen, während Muskeln mit einer geringen oxidativen Kapazität geringe Mengen an GPx enthalten^{186,187,191}.

In dieser Arbeit wurde die Muskelfaserzusammensetzung durch das Ausdauertraining mit einer hohen Intensität nur geringgradig in Richtung oxidativen Charakter verschoben. Laut Literatur besteht daher die Vermutung, dass der GPx-Gehalt eher niedrig ist¹⁸⁶. Durch das Ausdauertraining liegt zudem eine erhöhte ROS-Produktion vor. Hier kann eine zusätzliche hohe Niacinsupplementierung insofern hilfreich sein, da es in Form des Cofaktors NADPH daran mitwirkt ROS zu entgiften und so die Zellfunktion aufrecht zu erhalten. Die in dieser Arbeit signifikant erhöhten NAM-Konzentrationen im Plasma der Mäuse zeigen, dass eine Erklärung in diese Richtung möglich ist. Die ebenfalls beobachtete signifikant verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit durch die Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung könnte demnach auch über die mögliche verbesserte ROS-Eliminierung erklärt werden. Genauer gesagt, besteht die Möglichkeit, dass die erhöhte ROS-Produktion, die durch Ausdauertraining zustande kommt, in diesem Falle dadurch abgefangen wird, dass Niacin, als Vorstufe für NADPH fungiert. Dieses ist, wie oben erläutert, als Cofaktor für die ROS-Entgiftung über die GPx notwendig und kann über die zusätzliche hohe Niacinsupplementierung bereitgestellt werden. Weitere Daten aus Zellstudien bestätigen positive Effekte von Niacin auf Ausdauersport. So wird in einer Studie von Ganji *et al.* (2009) gezeigt, dass in Zellen eine Niacingabe dazu führte, dass die NADPH-Konzentration um 35-50 % anstieg und auch die GSH-Konzentrationen um 98 % angehoben wurde. Die ROS-

Produktion, gemessen an Superoxidanionen, konnte hingegen um 60 % eingedämmt werden¹⁹⁵. In einer anderen Studie resultierte eine Behandlung von Jurkat-Zellen mit Niacin oder NAM in erhöhten mRNA-Konzentration von G6PD¹⁶², womit die Entstehung der erhöhten NADPH-Konzentrationen möglicherweise erklärt werden kann. Obwohl es sich hierbei um Zellstudien handelt, ist es möglich, dass eine ähnliche Veränderung der NADPH-Konzentrationen und der Einfluss auf ROS durch Niacin auch in *in vivo* Experimenten nachgewiesen werden kann. Hier ist aber noch weitere Forschung nötig.

Auch die Wirkung der ROS auf die Zellmembranen sollte im Zusammenhang mit erniedrigten NAD-Konzentrationen nicht außer Acht gelassen werden. ROS können die Zellmembranen schädigen und wie schon beschrieben liegt vor allem beim Ausdauertraining eine erhöhte ROS-Produktion vor^{180,186}. Ebenso liegen erniedrigte NAD-Konzentrationen nach Ausdauertraining vor¹⁷⁷. Shibata *et al.* (2014) ließen daher die Vermutung zu, dass die geschädigten Zellmembranen der Muskelzellen durchlässig für NAD werden. Die Muskelzellen sind unter physiologischen Bedingungen nicht permeabel für NAD. Liegt nun eine Schädigung vor, geht NAD vom Blut in die Muskelzellen über, wodurch die erniedrigten NAD-Plasma-Konzentrationen erklärt werden können¹⁷⁷. Die Wirkung von Ausdauertraining auf die NAD-Konzentrationen ist in der Literatur jedoch nicht ganz einheitlich beschrieben. So konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass sich die NAD-Konzentrationen durch moderates Ausdauertraining bei Mäusen und beim Menschen erhöhen lassen¹⁹⁶. Natürlich sind die Dauer und die Intensität bei einem Training bis zur Erschöpfung oder bei einem moderaten Ausdauertraining sehr verschieden, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte, jedoch ist zusammenzufassen, dass das Training Einfluss auf die NAD-Konzentrationen im Plasma nimmt.

Eine Gruppe von Enzymen, die sensitiv auf den Redoxstatus der Zelle reagieren, sind die PARPs. PARP-1 ist das am besten untersuchte Protein der PARP Familie. Damit PARP gebildet werden kann, ist NAD als Substrat essentiell¹⁹⁷. Über Ausdauertraining durch ROS vermittelt, kann eine übermäßige durch PARP-1 hervorgerufene Poly-ADP-Ribosylierung (PARylierung) noch verstärkt werden. Diese vermindert die NAD-Konzentrationen in der Zelle und kann zum Zelltod führen. Eine basale Aktivität ist jedoch notwendig, um die normale Zellhomöostase

aufrechtzuerhalten, da die PARylierung eine wichtige posttranslationale Modifikation verschiedenster Proteine darstellt^{198–200}.

Mit diesen PARP Enzymen ist NAD also auf verschiedene Weisen verbunden. Zum einen muss eine erhöhte ROS-Produktion, beispielsweise durch Ausdauertraining induziert, abgefangen werden. Wie weiter oben erwähnt geschieht dies NAD-abhängig, da die antioxidativen Enzyme, GPx und PRDx, auf NADPH als Cofaktor angewiesen sind. GPx und PRDx sind wichtig, damit kein oxidativer Stress entsteht und PARP nicht übermäßig aktiviert wird, da dies wiederum zur Minderung der NAD-Konzentrationen im Zytosol führen würde. Die PARP-Aktivierung übernimmt jedoch auch physiologische Aufgaben, so zum Beispiel die DNA-Reparatur. Da in dieser Arbeit erhöhte NAM-Konzentrationen in den Gruppen mit der hohen Niacinsupplementierung gezeigt werden konnten, könnte eine Kombination aus einer hohen Niacinsupplementierung und Ausdauertraining von Vorteil sein bzw. eine Interaktion zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung vorliegen. Einerseits kann diese Kombination bzw. Interaktion zur Vermeidung von oxidativem Stress führen, da genügend Cofaktoren vorhanden sind, um die Reaktionen antioxidativer Enzyme aufrechtzuerhalten. Andererseits ist genügend Substrat für die physiologische PARP-Bildung vorhanden, womit die Möglichkeit besteht Schäden an der DNA, die im Rahmen von Ausdauertraining auftauchen, reparieren zu können.

Ausblick

Aus der Literatur geht hervor, dass Ausdauertraining und Niacinsupplementierung auch über andere als die hier untersuchten Mechanismen die Ausdauerleistungsfähigkeit verbessern können. Die möglichen Mechanismen zur Wirkung der Kombination dieser beiden Faktoren auf die Ausdauerleistungsfähigkeit müssen in zukünftigen Studien geklärt werden. Hintergründe zu der potentiellen Einflussnahme von einer Kombination aus bzw. einer Interaktion zwischen Niacinsupplementierung und Ausdauertraining auf die Ausdauerleistungsfähigkeit werden im Folgenden gegeben.

Einfluss des Niacins durch seine thermoregulatorische Funktion auf die Ausdauerleistungsfähigkeit

Eine weitere mögliche Erklärung, wie der Leistungsvorteil durch eine Niacin-Gabe zustande kommt, ist, dass Niacin über seine Nebenwirkung des *Flushing-Syndroms* die Körperkerntemperatur beeinflusst. So konnten Stephenson *et al.* (1989) zeigen, dass es im Zuge des *Flushing-Syndroms*, welches durch eine Niacin-Gabe induziert wird, zu einer verbesserten Durchblutung der Haut in den Armen und einer Verminderung der Körperkerntemperatur beim Menschen kommt²⁰¹. Eine verminderte Körpertemperatur kann sich positiv auf die Ausdauerleistungsfähigkeit auswirken, da der Körper, bei niedrigerer Temperatur weniger transpirieren muss, um Wärme abzugeben, was einen Leistungsvorteil nach sich zieht²⁰². Transporter, die mit der Thermoregulation in Verbindung gebracht werden, sind zum Einen *uncoupling protein-3* (UCP3) und zum Anderen der *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1)^{203,204}. Der UCP3 kommt vor allem in der Muskulatur vor. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Niacinsupplementierung der UCP3 bei Schweinen erhöht wird⁵⁴. Auch als Antwort auf Ausdauertraining findet im Rahmen der erhöhten Mitochondrienbiogenese eine erhöhte Expression des UCP3 statt²⁰⁵. Ob UCP3 eine Beeinflussung der Ausdauerleistungsfähigkeit induzieren kann, ist ungewiss, die Möglichkeit sollte jedoch in Betracht gezogen werden und weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang werden als sinnvoll erachtet.

Der Capsaicin-Rezeptor TRPV1 kann in der Muskulatur vorgefunden werden. Er kann durch erhöhte Temperaturen, wie sie im Rahmen von Ausdauertraining vorkommen, aktiviert werden. Die Verabreichung von Capsaicin bei Nagern war in der Lage den TRPV1 zu aktivieren und dadurch die Ausdauerleistungsfähigkeit zu erhöhen. Vermittelt wurde dieser Mechanismus über eine Hochregulierung des PGC-1 α und dessen bekannte Folgeerscheinungen wie ein erhöhter Fettsäuretransport, eine verbesserte oxidative Kapazität und eine verbesserte Mitochondrienaktivität²⁰³. Interessanterweise kann auch eine Niacin-Gabe eine Aktivierung des TRPV1 induzieren²⁰⁴.

Bei der Betrachtung der Thermoregulation ist festzustellen, dass teilweise die gleichen Proteine bzw. Ionenkanäle durch Ausdauertraining oder Niacingabe angesprochen werden. Untersuchungen mit einer Kombination dieser beiden Interventionen wäre in zukünftigen Studien sicherlich sinnvoll, um den Einfluss von Niacin und Ausdauertraining bzw. deren Interaktion auf die Thermoregulation zu untersuchen.

Mögliche Anwendung einer Kombination aus Ausdauertraining und Niacinsupplementierung in der Humanmedizin

Eine Niacinsupplementierung hat starke Effekte in Zuckerratten, die ein Übergewichtsmodell darstellen⁵². Übergewicht und Diabetes sind assoziiert mit einer verminderten oxidativen Kapazität, einer erhöhten glykolytischen Kapazität und einem verminderten Anteil von Typ I-Fasern in der Muskulatur^{206,207}. Da sowohl durch Ausdauertraining als auch durch Niacinsupplementierung diesen Eigenschaften in übergewichtigen Organismen entgegengewirkt werden kann, wäre es zumindest bei den Patienten, die Niacin in ihrer Therapie verabreicht bekommen, ratsam eine Kombination mit Ausdauertraining zu empfehlen. Es ist möglich, dass dadurch additive Effekte entstehen, wie sie die einzelnen Behandlungen nicht haben. Werden Ausdauertraining und Niacinsupplementierung kombiniert in die Therapie solcher Patienten integriert, könnten Risikofaktoren, wie Übergewicht, Dyslipoproteinämie und Vorgänge, wie ein erniedrigter Anteil der Typ I-Muskelfasern, einhergehend mit einer verminderten oxidativen Kapazität, durch eine erhöhte Effizienz der Therapie minimiert werden.

6 Zusammenfassung

Niacin spielt im Organismus eine vielfältige Rolle. Seit kurzem ist bekannt, dass Niacin auch Adaptionen, ähnlich wie sie durch Ausdauertraining entstehen, vermitteln kann. Zu diesen Anpassungen gehören ein erhöhter Anteil der oxidativen Typ I-Muskelfasern und ein verminderter Anteil der glykolytischen Typ II-Muskelfasern. Mit der veränderten Muskelfaserzusammensetzung gehen eine Änderung des Muskelphänotyps hin zu einem oxidativen Metabolismus, ebenso wie eine dafür benötigte Aktivierung bestimmter Schlüsselfaktoren einher. Eine wesentliche erwünschte Änderung, die durch Ausdauertraining auftritt, ist die Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit. Da davon auszugehen ist, dass die oben erwähnten Adaptionen wegbereitend für die verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit sind, soll anhand dieser Arbeit der Einfluss einer hohen Niacinsupplementierung auf die Ausdauerleistungsfähigkeit untersucht werden. Daher werden in dieser Arbeit drei Hypothesen überprüft:

- 1) Eine hohe Niacinsupplementierung verbessert die Ausdauerleistungsfähigkeit
- 2) Eine hohe Niacinsupplementierung verbessert die Ausdauerleistungsfähigkeit im selben Ausmaß wie Ausdauertraining
- 3) Eine hohe Niacinsupplementierung hat in Kombination mit Ausdauertraining stärkere Effekte auf die Ausdauerleistungsfähigkeit als eine alleinige hohe Niacinsupplementierung oder alleiniges Ausdauertraining

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung von Ausdauertraining, hoher Niacinsupplementierung und einer Kombination aus Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf die Ausdauerleistungsfähigkeit, auf Veränderungen in der Muskelfaserzusammensetzung und auf den Muskelphänotyp der Mäuse untersucht. Dazu wurden 40 Mäuse in vier Gruppen eingeteilt: $NIA_{adä}$, $NIA_{adä} + AT$, NIA_{hoch} und $NIA_{hoch} + AT$. Die Versuchsdauer umfasste sechs Wochen, in denen die Mäuse, welche Ausdauertraining erhielten, pro Woche fünf Mal für je 30 min auf dem Laufband bei einer Intensität von 80 % VO_{2max} trainierten. Die Gruppen mit der hohen Niacinsupplementierung bekamen eine Niacindosis, wie sie auch im Bereich der Humanmedizin zur Therapie von Dyslipoproteinämien eingesetzt wird. Die anderen Mäuse bekamen eine Diät, welche ihren Niacinbedarf deckte. Getestet wurde die Ausdauerleistungsfähigkeit durch einen Ergospirometrie-Stufentest, bei dem die Mäuse bis zur Erschöpfung liefen.

Die Ausdauerleistung wurde in allen vier gemessenen Parametern (Distanz, $VO_2\text{max}$, Geschwindigkeit und Dauer) durch das Ausdauertraining positiv beeinflusst. Hier erstmals gezeigt werden konnte ebenso eine Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung, die die Ausdauerleistung in noch stärkerem Maße als das alleinige Ausdauertraining verbesserte. Ein Einfluss der hohen Niacinsupplementierung konnte nicht gezeigt werden.

Aufgrund der bisher vorliegenden Literatur wurde vermutet, dass die Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit auf einer Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung und des Muskelphänotyps basiert. Daher wurden die Muskelfaserzusammensetzung und der oxidative Metabolismus des Muskels untersucht. Hier zeigte sich, dass weder die alleinige hohe Niacinsupplementierung die Muskelfaserzusammensetzung und den oxidativen Muskelphänotyp wesentlich veränderte, noch lag eine Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung vor. Die Untersuchungen des Kohlenhydratstoffwechsels im Muskel zeigten hingegen bei einer Mehrzahl der untersuchten mRNA-Konzentrationen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus Erhöhungen durch die alleinige hohe Niacinsupplementierung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen Ausdauertraining und hoher Niacinsupplementierung auf eine verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit sehr groß ist. Die verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit basiert jedoch nicht eindeutig auf einem veränderten Fettsäuren- oder Kohlenhydratmetabolismus. Warum die Wirkung des Ausdauertrainings auf die Ausdauerleistung zusammen mit einer hohen Niacinsupplementierung viel stärker ist als bei einer adäquaten Niacinsupplementierung kann anhand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden. Eventuell kann Niacin als Coenzym in eine Reihe von anderen, hier nicht untersuchten, Mechanismen eingreifen.

Vor dem Hintergrund der erhöhten Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Übergewicht und Insulinresistenz beim Menschen, wäre Ausdauertraining zusätzlich zu einer eingesetzten Niacintherapie eventuell von Vorteil, da aus der Literatur hervorgeht, dass sich die Effekte von Niacin positiv auf übergewichtige Organismen und deren oxidativen Muskelphänotyp auswirken. Dies lässt sich jedoch anhand dieser Arbeit nicht erörtern und muss in weiterfolgenden Versuchen bestätigt werden.

Summary

Niacin has a variety of functions in the organism. From recent literature it is known that Niacin is able to induce adaptations, similar to the ones endurance training is able to mediate. Part of those adaptations are an increased proportion of oxidative type I-muscle fibers, a decreased proportion of glycolytic type II-muscle fibers and a change in the muscle phenotype accompanied by activation of certain key regulators. A crucial and desirable change that occurs due to endurance training is the improved endurance capacity. The above stated adaptations are presumably the basis for the improved endurance capacity. Therefore within this thesis the effect of a high niacin supplementation on the endurance capacity is examined. Three hypotheses are going to be verified:

- 1) A high Niacin supplementation improves the endurance capacity
- 2) A high Niacin supplementation improves the endurance capacity to the same extent endurance training does
- 3) A combination of a high niacin supplementation and endurance training has stronger effects on the endurance capacity than exclusive niacin supplementation or endurance training have

In the presented thesis the effects of endurance training, high niacin supplementation and the combination of endurance training and high niacin supplementation on endurance capacity, muscle fiber distribution and muscle phenotype were investigated. Therefore 40 mice were assigned into four groups: NIA_{adä}, NIA_{adä} + AT, NIA_{hoch} and NIA_{hoch} + AT. The duration of the trial was six weeks. The prescribed training of the mice that participated in the endurance training consisted of a run on a treadmill five times per week each day for 30 minutes with an intensity of 80 % VO₂max. The mice that received the high niacin supplementation got a niacin-dosage that is comparable to the one used in treatment of dyslipoproteinemia in humans. The mice on the normal niacin-diet had a niacin-concentration in their diet that covered their niacin-requirements. The endurance capacity was tested by an ergospirometry-step-test, where all of the mice ran to total exhaustion.

Endurance training improved the endurance capacity in all four of the measured parameters (distance, VO_2 max, speed and duration). Furthermore it was shown for the first time that the interaction between endurance training and high niacin supplementation improved the endurance capacity even more than the endurance training itself did. High niacin supplementation had no effect on the endurance capacity.

According to the published literature the improvement of the endurance capacity is based on a change in the muscle fiber distribution and a change in the oxidative muscle phenotype. Therefore in this thesis the proportion of the different muscle fibers and the oxidative metabolism of the muscle were examined. It was shown that the high niacin supplementation caused no crucial change in the muscle fiber distribution and no change in the muscle phenotype, furthermore there was no interaction of endurance training and high niacin supplementation. There were different results in the examination of the carbohydrate metabolism though. The majority of the investigated mRNA-concentrations were elevated through the high niacin supplementation.

These results show that the interaction between endurance training and high niacin supplementation improves the endurance capacity. But this effect is not based on a change in the fatty acid or carbohydrate metabolism. The reason why the endurance training in combination with a high niacin supplementation is more beneficial and creates a strong significant improvement on the endurance capacity whereas the combination with the adequate niacin supplementation has a weaker effect is not answered through the examinations done in this thesis. It is possible that niacin, and its function as a coenzyme, participates in different mechanisms that are not examined here.

According to literature and regarding the rising prevalence of cardio-vascular-diseases, obesity and insulin resistance in humans, it is possible that endurance training in combination with a niacin treatment, that the patients are already receiving, would be a preferred choice, because of the effects of niacin on obese organisms and the effect on the oxidative metabolism. Nevertheless, this should be the subject of further studies and is not answered by the present thesis.

7 Literatur

1. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. (Wiley-Blackwell, Oxford, 2012).
2. *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. 1st ed. (Umschau-Verl., Frankfurt am Main, 2012).
3. Houtkooper, R. H. & Auwerx, J. Exploring the therapeutic space around NAD⁺. *The Journal of Cell Biology* **199**, 205–209 (2012).
4. Koltai, E. *et al.* Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development* **131**, 21–28 (2010).
5. Rolfe, H. M. A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *Journal of Cosmetic Dermatology* **13**, 324–328 (2014).
6. Quabbe, H. J., Luyckx, A. S., L'age, M. & Schwarz, C. Growth hormone, cortisol, and glucagon concentrations during plasma free fatty acid depression: different effects of nicotinic acid and an adenosine derivative (BM 11.189). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **57**, 410–414 (1983).
7. Watt, M. J. *et al.* Reduced plasma FFA availability increases net triacylglycerol degradation, but not GPAT or HSL activity, in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **287**, E120-7 (2004).
8. O'Neill, M., Watt, M. J., Heigenhauser, G. J. F. & Spriet, L. L. Effects of reduced free fatty acid availability on hormone-sensitive lipase activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **97**, 1938–1945 (2004).
9. Plaisance, E. P., Grandjean, P. W., Brunson, B. L. & Judd, R. L. Increased total and high-molecular weight adiponectin after extended-release niacin. *Metabolism: Clinical and Experimental* **57**, 404–409 (2008).
10. Westphal, S., Borucki, K., Taneva, E., Makarova, R. & Luley, C. Extended-release niacin raises adiponectin and leptin. *Atherosclerosis* **193**, 361–365 (2007).

11. Trost, S., Wilcox, A. & Gillis, D. The effect of substrate utilization, manipulated by nicotinic acid, on excess postexercise oxygen consumption. *International Journal of Sports Medicine* **18**, 83–88 (1997).
12. Kang, I., Kim, S.-W. & Youn, J. H. Effects of nicotinic acid on gene expression: potential mechanisms and implications for wanted and unwanted effects of the lipid-lowering drug. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96**, 3048–3055 (2011).
13. Bogan, K. L. & Brenner, C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annual Review of Nutrition* **28**, 115–130 (2008).
14. Chapman, M. J., Redfern, J. S., McGovern, M. E. & Giral, P. Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk. *Pharmacology & Therapeutics* **126**, 314–345 (2010).
15. Organization, W. H. *World Health Statistics 2015* (World Health Organization, Geneva, 2015).
16. Roger, V. L. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **125**, e2-e220 (2012).
17. P. Schwandt, K. G. Parhofer & G. Assmann (eds.). *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Dyslipoproteinämien und Atherosklerose: Diagnostik, Therapie und Prävention ; mit 193 Tabellen* (Schattauer, Stuttgart, 2007).
18. Brunzell, J. D. Clinical practice. Hypertriglyceridemia. *The New England Journal of Medicine* **357**, 1009–1017 (2007).
19. Gille, A., Bodor, E. T., Ahmed, K. & Offermanns, S. Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**, 79–106 (2008).
20. Stone, N. J. *et al.* 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **129**, S1-45 (2014).

21. Sando, K. R. & Knight, M. Nonstatin therapies for management of dyslipidemia: a review. *Clinical Therapeutics* **37**, 2153–2179 (2015).
22. Gupta, S. LDL cholesterol, statins and PCSK 9 inhibitors. *Indian Heart Journal* **67**, 419–424 (2015).
23. Wise, A. *et al.* Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 9869–9874 (2003).
24. Morrow, J. D., Awad, J. A., Oates, J. A. & Roberts, L. J. 2. Identification of skin as a major site of prostaglandin D2 release following oral administration of niacin in humans. *The Journal of Investigative Dermatology* **98**, 812–815 (1992).
25. Tunaru, S., Lattig, J., Kero, J., Krause, G. & Offermanns, S. Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Molecular Pharmacology* **68**, 1271–1280 (2005).
26. Shomali, T., Mosleh, N. & Kamalpour, M. Screening of Different Organs of Rats for HCA2 Receptor mRNA. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* **3**, 126–129 (2014).
27. Titgemeyer, E. C., Mamedova, L. K., Spivey, K. S., Farney, J. K. & Bradford, B. J. An unusual distribution of the niacin receptor in cattle. *Journal of Dairy Science* **94**, 4962–4967 (2011).
28. Tunaru, S. *et al.* PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nature Medicine* **9**, 352–355 (2003).
29. Karpe, F. & Frayn, K. N. The nicotinic acid receptor--a new mechanism for an old drug. *Lancet (London, England)* **363**, 1892–1894 (2004).
30. Wang, W. *et al.* Effect of nicotinic acid administration on hepatic very low density lipoprotein-triglyceride production. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **280**, E540-7 (2001).
31. Pereira, J. N. The plasma free fatty acid rebound induced by nicotinic acid. *Journal of Lipid Research* **8**, 239–244 (1967).
32. Poynten, A. M. *et al.* Nicotinic acid-induced insulin resistance is related to increased circulating fatty acids and fat oxidation but not muscle lipid content. *Metabolism* **52**, 699–704 (2003).

33. Heath, E. M., Wilcox, A. R. & Quinn, C. M. Effects of nicotinic acid on respiratory exchange ratio and substrate levels during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **25**, 1018–1023 (1993).
34. Oh, Y. T. *et al.* Continuous 24-h nicotinic acid infusion in rats causes FFA rebound and insulin resistance by altering gene expression and basal lipolysis in adipose tissue. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **300**, E1012-21 (2011).
35. Tavintharan, S., Sivakumar, M., Lim, S. C. & Sum, C. F. Niacin affects cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 cells. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* **376**, 41–44 (2007).
36. Choi, S. *et al.* Widespread effects of nicotinic acid on gene expression in insulin-sensitive tissues: implications for unwanted effects of nicotinic acid treatment. *Metabolism: Clinical and Experimental* **60**, 134–144 (2011).
37. Ganji, S. H. *et al.* Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *Journal of Lipid Research* **45**, 1835–1845 (2004).
38. Jin, F. Y., Kamanna, V. S. & Kashyap, M. L. Niacin accelerates intracellular ApoB degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **19**, 1051–1059 (1999).
39. Hernandez, C., Molusky, M., Li, Y., Li, S. & Lin, J. D. Regulation of hepatic ApoC3 expression by PGC-1beta mediates hypolipidemic effect of nicotinic acid. *Cell Metabolism* **12**, 411–419 (2010).
40. Cooper, D. L., Murrell, D. E., Roane, D. S. & Harirforoosh, S. Effects of formulation design on niacin therapeutics: mechanism of action, metabolism, and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **490**, 55–64 (2015).
41. Guyton, J. R. Extended-release niacin for modifying the lipoprotein profile. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **5**, 1385–1398 (2004).
42. Kamanna, V. S. & Kashyap, M. L. Mechanism of action of niacin. *The American Journal of Cardiology* **101**, 20B–26 (2008).

43. Le Bloc'h, J. *et al.* Nicotinic Acid Accelerates HDL Cholesteryl Ester Turnover in Obese Insulin-Resistant Dogs. *PloS One* **10**, e0136934 (2015).
44. Rubic, T., Trottmann, M. & Lorenz, R. L. Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoïd cells by niacin. *Biochemical Pharmacology* **67**, 411–419 (2004).
45. Zhao, S.-p., Yang, J., Li, J., Dong, S.-z. & Wu, Z.-h. Effect of niacin on LXRA and PPARγ expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits. *International Journal of Cardiology* **124**, 172–178 (2008).
46. Hanson, J. *et al.* Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2-dependent prostanoid formation in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **120**, 2910–2919 (2010).
47. Lukasova, M., Hanson, J., Tunaru, S. & Offermanns, S. Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. *Trends in Pharmacological Sciences* **32**, 700–707 (2011).
48. Dalton, T. A. & Berry, R. S. Hepatotoxicity associated with sustained-release niacin. *The American Journal of Medicine* **93**, 102–104 (1992).
49. Bhardwaj, S. S. & Chalasani, N. Lipid-lowering agents that cause drug-induced hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease* **11**, 597-613, vii (2007).
50. Menon, R. M. *et al.* Effect of the rate of niacin administration on the plasma and urine pharmacokinetics of niacin and its metabolites. *Journal of Clinical Pharmacology* **47**, 681–688 (2007).
51. Watt, M. J., Southgate, R. J., Holmes, A. G. & Febbraio, M. A. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *Journal of Molecular Endocrinology* **33**, 533–544 (2004).
52. Ringseis, R. *et al.* Supplementing obese Zucker rats with niacin induces the transition of glycolytic to oxidative skeletal muscle fibers. *The Journal of Nutrition* **143**, 125–131 (2013).

53. Khan, M. *et al.* Niacin supplementation induces type II to type I muscle fiber transition in skeletal muscle of sheep. *Acta Veterinaria Scandinavica* **55**, 85 (2013).
54. Khan, M. *et al.* Niacin supplementation increases the number of oxidative type I fibers in skeletal muscle of growing pigs. *BMC Veterinary Research* **9**, 177 (2013).
55. Torhan, A. S., Cheewatrakoolpong, B., Kwee, L. & Greenfeder, S. Cloning and characterization of the hamster and guinea pig nicotinic acid receptors. *Journal of Lipid Research* **48**, 2065–2071 (2007).
56. M. Kjaer (ed.). *Textbook of sports medicine. Basic Science and Clinical Aspects of Sports Injury and Physical Activity* (Blackwell Science, Malden, Mass, 2003).
57. R. F. Schmidt & F. Lang (eds.). *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie* (Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2007).
58. Zwetsloot, K. A., Laye, M. J. & Booth, F. W. Novel epigenetic regulation of skeletal muscle myosin heavy chain genes. Focus on "Differential epigenetic modifications of histones at the myosin heavy chain genes in fast and slow skeletal muscle fibers and in response to muscle unloading". *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **297**, C1-3 (2009).
59. Janssen, I., Heymsfield, S. B., Baumgartner, R. N. & Ross, R. Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **89**, 465–471 (2000).
60. Egan, B. & Zierath, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism* **17**, 162–184 (2013).
61. Murgia, M. *et al.* Single muscle fiber proteomics reveals unexpected mitochondrial specialization. *EMBO Reports* **16**, 387–395 (2015).
62. Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 19–37 (2006).
63. Lin, J. *et al.* Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797–801 (2002).

64. van Loon, Luc J C *et al.* Intramyocellular lipids form an important substrate source during moderate intensity exercise in endurance-trained males in a fasted state. *The Journal of Physiology* **553**, 611–625 (2003).
65. Achten, J. & Jeukendrup, A. E. Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **20**, 716–727 (2004).
66. Grimaldi, P. A. Regulatory role of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta) in muscle metabolism. A new target for metabolic syndrome treatment? *Biochimie* **87**, 5–8 (2005).
67. Sugden, M. C., Caton, P. W. & Holness, M. J. PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC. *The Journal of Endocrinology* **204**, 93–104 (2010).
68. Gutgesell, A. *et al.* Mouse carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) is transcriptionally regulated by PPARalpha and PPARdelta in liver cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1790**, 1206–1216 (2009).
69. Abdelrahman, M., Sivarajah, A. & Thiemermann, C. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovascular Research* **65**, 772–781 (2005).
70. Lin, J. D. Minireview: the PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **23**, 2–10 (2009).
71. Calvo, J. A. *et al.* Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **104**, 1304–1312 (2008).
72. Handschin, C. *et al.* Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 30014–30021 (2007).
73. Luquet, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 2299–2301 (2003).
74. Wang, Y.-X. *et al.* Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biology* **2**, e294 (2004).

75. Frohnert, B. I., Hui, T. Y. & Bernlohr, D. A. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 3970–3977 (1999).
76. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A. & Evans, R. M. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**, 241–252 (1998).
77. Schuler, M. *et al.* PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metabolism* **4**, 407–414 (2006).
78. Arany, Z. *et al.* The transcriptional coactivator PGC-1 β drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metabolism* **5**, 35–46 (2007).
79. Chinsomboon, J. *et al.* The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 21401–21406 (2009).
80. Tadaishi, M. *et al.* Effect of exercise intensity and AICAR on isoform-specific expressions of murine skeletal muscle PGC-1 α mRNA: a role of $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **300**, E341-9 (2011).
81. Jensen, L., Bangsbo, J. & Hellsten, Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **557**, 571–582 (2004).
82. Hagberg, C. E. *et al.* Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* **464**, 917–921 (2010).
83. Couturier, A., Ringseis, R., Most, E. & Eder, K. Pharmacological doses of niacin stimulate the expression of genes involved in carnitine uptake and biosynthesis and improve the carnitine status of obese Zucker rats. *BMC Pharmacology & Toxicology* **15**, 37 (2014).
84. Ringseis, R. *et al.* Regular endurance exercise improves the diminished hepatic carnitine status in mice fed a high-fat diet. *Molecular Nutrition & Food Research* **55 Suppl 2**, S193-202 (2011).

85. Cataneo, D. C., Kobayasi, S., Carvalho, L. R. d., Paccanaro, R. C. & Cataneo, A. J. M. Accuracy of six minute walk test, stair test and spirometry using maximal oxygen uptake as gold standard. *Acta Cirurgica Brasileira* **25**, 194–200 (2010).
86. Hoydal, M. A., Wisloff, U., Kemi, O. J. & Ellingsen, O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* **14**, 753–760 (2007).
87. Helgerud, J. *et al.* Aerobic high-intensity intervals improve VO₂max more than moderate training. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **39**, 665–671 (2007).
88. Schefer, V. & Talan, M. I. Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Experimental Gerontology* **31**, 387–392 (1996).
89. Lightfoot, J. T., Turner, M. J., Debate, K. A. & Kleeberger, S. R. Interstrain variation in murine aerobic capacity. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **33**, 2053–2057 (2001).
90. Lerman, I. *et al.* Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **92**, 2245–2255 (2002).
91. Ghosh, S., Golbidi, S., Werner, I., Verchere, B. C. & Laher, I. Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview. *Clinical Science (London, England: 1979)* **119**, 57–74 (2010).
92. Saxena, A. *et al.* Effect of exercise on chemically-induced colitis in adiponectin deficient mice. *Journal of Inflammation (London, England)* **9**, 30 (2012).
93. Wohlers, L. M., Jackson, K. C. & Spangenburg, E. E. Lipolytic signaling in response to acute exercise is altered in female mice following ovariectomy. *Journal of Cellular Biochemistry* **112**, 3675–3684 (2011).
94. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc

- writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition* **123**, 1939–1951 (1993).
95. Viru, A. & Viru, M. *Biochemical Monitoring of Sport Training* (Human Kinetics, Champaign, Ill., 2001).
96. Corbach, S. *Untersuchung der CO₂-Euthanasie bei Labormäusen auf Tierschutzgerechtigkeit*. Tierärztl. Hochsch., Institut für Tierschutz und Verhalten, Diss.--Hannover, 2006. 1st ed. (DVG Service; Tierärztl. Hochsch, Gießen, Hannover, 2006).
97. Tschop, M. H. *et al.* A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nature Methods* **9**, 57–63 (2012).
98. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354 (1979).
99. Liu, M. *et al.* Simultaneous quantification of niacin and its three main metabolites in human plasma by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the Biomedical and Life Sciences* **904**, 107–114 (2012).
100. H. Greiling, T. Arndt & R. Kock (eds.). *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Mit 361 Tabellen, einem Register zum Gegenstandskatalog sowie einem Verzeichnis der klinisch-chemischen Meßgrößen* (Schattauer, Stuttgart, 1995).
101. Hirche, F., Fischer, M., Keller, J. & Eder, K. Determination of carnitine, its short chain acyl esters and metabolic precursors trimethyllysine and gamma-butyrobetaine by quasi-solid phase extraction and MS/MS detection. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **877**, 2158–2162 (2009).
102. Dawson, K. D., Baker, D. J., Greenhaff, P. L. & Gibala, M. J. An acute decrease in TCA cycle intermediates does not affect aerobic energy delivery in contracting rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **565**, 637–643 (2005).

103. Essén-Gustavsson, B., Karlström, K. & Lundström, K. Muscle fibre characteristics and metabolic response at slaughter in pigs of different halothane genotypes and their relation to meat quality. *Meat Science* **31**, 1–11 (1992).
104. Hoppe-Seyler, F. und Thierfelder, H. Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Zehnte Auflage, Springer Verlag GmbH Berlin, Heilderberg (1966).
105. Bloemberg, D. & Quadrilatero, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PloS One* **7**, e35273 (2012).
106. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
107. Baar, K. Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **38**, 1939–1944 (2006).
108. Dube, J. J. *et al.* Adipose triglyceride lipase deletion from adipocytes, but not skeletal myocytes, impairs acute exercise performance in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **308**, E879-90 (2015).
109. Sato, T., Morita, A., Mori, N. & Miura, S. Glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 deficiency enhances exercise capacity due to increased lipid oxidation during strenuous exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **457**, 653–658 (2015).
110. Jiang, L. Q., Garcia-Roves, P. M., Castro Barbosa, T. de & Zierath, J. R. Constitutively active calcineurin in skeletal muscle increases endurance performance and mitochondrial respiratory capacity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **298**, E8-E16 (2010).
111. Larsen, S. *et al.* The effect of high-intensity training on mitochondrial fat oxidation in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **25**, e59-69 (2015).
112. Bishop-Bailey, D. PPARs and angiogenesis. *Biochemical Society Transactions* **39**, 1601–1605 (2011).

113. Caffin, F. *et al.* Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice. *The Journal of Physiology* **591**, 6017–6037 (2013).
114. Vigelso, A., Andersen, N. B. & Dela, F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* **6**, 84–101 (2014).
115. Wilson, J. M. *et al.* The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **26**, 1724–1729 (2012).
116. Drexel, H. Statins, fibrates, nicotinic acid, cholesterol absorption inhibitors, anion-exchange resins, omega-3 fatty acids: which drugs for which patients? *Fundamental & Clinical Pharmacology* **23**, 687–692 (2009).
117. Speakman, J. R. Body size, energy metabolism and lifespan. *The Journal of Experimental Biology* **208**, 1717–1730 (2005).
118. Goldie, C. *et al.* Niacin therapy and the risk of new-onset diabetes: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart (British Cardiac Society)* **102**, 198–203 (2016).
119. Glaser, B. W., You, G., Zhang, M. & Medler, S. Relative proportions of hybrid fibres are unaffected by 6 weeks of running exercise in mouse skeletal muscles. *Experimental Physiology* **95**, 211–221 (2010).
120. Kilikevicius, A. *et al.* Divergent physiological characteristics and responses to endurance training among inbred mouse strains. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **23**, 657–668 (2013).
121. E, L., Lu, J., Burns, J. M. & Swerdlow, R. H. Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures. *Experimental Physiology* **98**, 207–219 (2013).
122. Leick, L. *et al.* PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **294**, E463-74 (2008).

123. Leick, L. *et al.* PGC-1 α mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **297**, E92-103 (2009).
124. Scholz, K. *et al.* Supplementing healthy rats with a high-niacin dose has no effect on muscle fiber distribution and muscle metabolic phenotype. *European Journal of Nutrition* **53**, 1229–1236 (2014).
125. Cornachione, A. S., Benedini-Elias, P. C. O., Polizello, J. C., Carvalho, L. C. & Mattiello-Sverzut, A. C. Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. *Acta Histochemica et Cytochemica* **44**, 43–50 (2011).
126. Delp, M. D. & Duan, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **80**, 261–270 (1996).
127. Kava, R., Greenwood, M. R. C. & Johnson, P. R. Zucker (fa/fa) Rat. *ILAR Journal* **32**, 4–8 (1990).
128. Yokoi, N. *et al.* A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. *Journal of Diabetes Research* **2013**, 103731 (2013).
129. Reyes, N. L. *et al.* Fnip1 regulates skeletal muscle fiber type specification, fatigue resistance, and susceptibility to muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 424–429 (2015).
130. O'Neill, H. M., Holloway, G. P. & Steinberg, G. R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* **366**, 135–151 (2013).
131. Li, G. *et al.* Distinct kinetic and spatial patterns of protein kinase C (PKC)- and epidermal growth factor receptor (EGFR)-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by human nicotinic acid receptor GPR109A. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 31199–31212 (2011).
132. Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews* **24**, 78–90 (2003).

133. Canto, C. *et al.* Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metabolism* **11**, 213–219 (2010).
134. Penumathsa, S. V. *et al.* Niacin bound chromium treatment induces myocardial Glut-4 translocation and caveolar interaction via Akt, AMPK and eNOS phosphorylation in streptozotocin induced diabetic rats after ischemia-reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta* **1792**, 39–48 (2009).
135. Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J. & Auwerx, J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine Reviews* **31**, 194–223 (2010).
136. Narkar, V. A. *et al.* AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* **134**, 405–415 (2008).
137. Watt, M. J., Heigenhauser, G. J. F., O'Neill, M. & Spriet, L. L. Hormone-sensitive lipase activity and fatty acyl-CoA content in human skeletal muscle during prolonged exercise. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **95**, 314–321 (2003).
138. Lelliott, C. J. *et al.* Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biology* **4**, e369 (2006).
139. Dulloo, A. G., Gubler, M., Montani, J. P., Seydoux, J. & Solinas, G. Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* **28 Suppl 4**, S29-37 (2004).
140. Narkar, V. A. *et al.* Exercise and PGC-1alpha-independent synchronization of type I muscle metabolism and vasculature by ERRgamma. *Cell Metabolism* **13**, 283–293 (2011).
141. Kerner, J. & Hoppel, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica acta* **1486**, 1–17 (2000).

142. Zammit, V. A., Ramsay, R. R., Bonomini, M. & Arduini, A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 1353–1362 (2009).
143. Bays, H. E. & Rader, D. J. Does nicotinic acid (niacin) lower blood pressure? *International Journal of Clinical Practice* **63**, 151–159 (2009).
144. van Loon, L. J., Greenhaff, P. L., Constantin-Teodosiu, D., Saris, W. H. & Wagenmakers, A. J. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *The Journal of Physiology* **536**, 295–304 (2001).
145. Gomes, F. R. *et al.* Glycogen storage and muscle glucose transporters (GLUT-4) of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *The Journal of Experimental Biology* **212**, 238–248 (2009).
146. M. Hargreaves & L. L. Spriet (eds.). *Exercise Metabolism* (Human Kinetics, Champaign, IL, 2006).
147. Howlett, K. F., Spriet, L. L. & Hargreaves, M. Carbohydrate metabolism during exercise in females: effect of reduced fat availability. *Metabolism: Clinical and Experimental* **50**, 481–487 (2001).
148. Jensen, J., Rustad, P. I., Kolnes, A. J. & Lai, Y.-C. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. *Frontiers in Physiology* **2**, 112 (2011).
149. Kawanaka, K., Nolte, L. A., Han, D. H., Hansen, P. A. & Holloszy, J. O. Mechanisms underlying impaired GLUT-4 translocation in glycogen-supercompensated muscles of exercised rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **279**, E1311-8 (2000).
150. Barnes, B. R. *et al.* 5'-AMP-activated protein kinase regulates skeletal muscle glycogen content and ergogenics. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 773–779 (2005).
151. Barnes, B. R. *et al.* The 5'-AMP-activated protein kinase gamma3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 38441–38447 (2004).

152. Nakatani, A. *et al.* Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **82**, 711–715 (1997).
153. Horn, F. & Moc, I. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 5th ed. (Thieme, Stuttgart, 2012).
154. Lanham-New, S., Stear, S., Shirreffs, S. & Collins, A. *Sport and Exercise Nutrition* (John Wiley & Sons, Hoboken, 2011).
155. Quinlan, K. G. R. *et al.* Alpha-actinin-3 deficiency results in reduced glycogen phosphorylase activity and altered calcium handling in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics* **19**, 1335–1346 (2010).
156. Lee, F. X. Z., Houweling, P. J., North, K. N. & Quinlan, K. G. R. How does alpha-actinin-3 deficiency alter muscle function? Mechanistic insights into ACTN3, the 'gene for speed'. *Biochimica et Biophysica Acta* **1863**, 686–693 (2016).
157. North, K. Why is alpha-actinin-3 deficiency so common in the general population? The evolution of athletic performance. *Twin Research and Human Genetics : the Official Journal of the International Society for Twin Studies* **11**, 384–394 (2008).
158. Pederson, B. A. *et al.* Exercise capacity of mice genetically lacking muscle glycogen synthase: in mice, muscle glycogen is not essential for exercise. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 17260–17265 (2005).
159. Pederson, B. A. *et al.* Mice with elevated muscle glycogen stores do not have improved exercise performance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**, 491–496 (2005).
160. Phan, B. A. P. *et al.* Effects of niacin on glucose levels, coronary stenosis progression, and clinical events in subjects with normal baseline glucose levels (<100 mg/dl): a combined analysis of the Familial Atherosclerosis Treatment Study (FATS), HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS), Armed Forces Regression Study (AFREGS), and Carotid Plaque Composition by MRI during lipid-lowering (CPC) study. *The American Journal of Cardiology* **111**, 352–355 (2013).

161. McGee, S. L. *et al.* AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* **57**, 860–867 (2008).
162. Yan, Q. *et al.* The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA in Jurkat cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 133–136 (1999).
163. Fritzen, A. M. *et al.* 5'-AMP activated protein kinase alpha2 controls substrate metabolism during post-exercise recovery via regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4. *The Journal of Physiology* **593**, 4765–4780 (2015).
164. Hayashi, T., Hirshman, M. F., Kurth, E. J., Winder, W. W. & Goodyear, L. J. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* **47**, 1369–1373 (1998).
165. Musi, N. *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. *Diabetes* **50**, 921–927 (2001).
166. Musi, N. *et al.* AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism* **280**, E677-84 (2001).
167. Rockl, K. S. C. *et al.* Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes* **56**, 2062–2069 (2007).
168. Merrill, G. F., Kurth, E. J., Hardie, D. G. & Winder, W. W. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American Journal of Physiology* **273**, E1107-12 (1997).
169. Lee, W. J. *et al.* AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**, 291–295 (2006).
170. Victoria, C. R. Jejunal electrogenic transport of glucose in rats with niacin deficiency. *Arquivos de Gastroenterologia* **31**, 18–23 (1994).

171. Victoria, C. R. & Meneghelli, U. G. Kinetics of jejunal glucose transport in niacin deficient rats. *Arquivos de Gastroenterologia* **27**, 191–196 (1990).
172. Wong, T. P., Chan, L. K. Y. & Leung, P. S. Involvement of the Niacin Receptor GPR109a in the Local Control of Glucose Uptake in Small Intestine of Type 2 Diabetic Mice. *Nutrients* **7**, 7543–7561 (2015).
173. Goldberg, I. J. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**, 965–971 (2001).
174. Shao, J., Yamashita, H., Qiao, L., Draznin, B. & Friedman, J. E. Phosphatidylinositol 3-kinase redistribution is associated with skeletal muscle insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Diabetes* **51**, 19–29 (2002).
175. Michael, L. F. *et al.* Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3820–3825 (2001).
176. Drake, J. C., Wilson, R. J. & Yan, Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **30**, 13–22 (2016).
177. Shibata, K., Matsumoto, K., Fushiki, T. & Sugimoto, E. Effects of Exercise on the Metabolism of NAD in Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **58**, 1763–1766 (2014).
178. Williams, A. C., Cartwright, L. S. & Ramsden, D. B. Parkinson's disease: the first common neurological disease due to auto-intoxication? *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians* **98**, 215–226 (2005).
179. Chlopicki, S. *et al.* Single bout of endurance exercise increases NNMT activity in the liver and MNA concentration in plasma; the role of IL-6. *Pharmacological Reports : PR* **64**, 369–376 (2012).
180. Sukhodub, A. *et al.* Nicotinamide-rich diet improves physical endurance by up-regulating SUR2A in the heart. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **15**, 1703–1712 (2011).

181. Flagg, T. P., Enkvetchakul, D., Koster, J. C. & Nichols, C. G. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiological Reviews* **90**, 799–829 (2010).
182. Montecucco, F. *et al.* Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors as therapeutics: rationales, controversies, clinical experience. *Current Drug Targets* **14**, 637–643 (2013).
183. Baar, K. Using molecular biology to maximize concurrent training. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **44 Suppl 2**, S117-25 (2014).
184. Brandauer, J. *et al.* AMP-activated protein kinase regulates nicotinamide phosphoribosyl transferase expression in skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **591**, 5207–5220 (2013).
185. Costford, S. R. *et al.* Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism* **298**, E117-26 (2010).
186. Powers, S. K., Ji, L. L., Kavazis, A. N. & Jackson, M. J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology* **1**, 941–969 (2011).
187. Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H. & Atalay, M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**, 1208–1246 (2013).
188. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44–84 (2007).
189. Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* **24**, 981–990 (2012).
190. Martindale, J. L. & Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* **192**, 1–15 (2002).

191. Nunes Silva, A. The Association between Physical Exercise and Reactive Oxygen Species (ROS) Production. *J Sports Med Dopng Stud* **05** (2015).
192. D. MacLaren (ed.). *Nutrition and Sport* (Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh u. a., 2007).
193. Powers, S. K. & Jackson, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews* **88**, 1243–1276 (2008).
194. Matoba, H. Reactive oxygen species and endurance training-induced adaptations. *JPFMS* **2**, 463–467 (2013).
195. Ganji, S. H., Qin, S., Zhang, L., Kamanna, V. S. & Kashyap, M. L. Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* **202**, 68–75 (2009).
196. Fukuwatari, T., Shibata, K., Ishihara, K., Fushiki, T. & Sugimoto, E. Elevation of blood NAD level after moderate exercise in young women and mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **47**, 177–179 (2001).
197. White, A. T. & Schenk, S. NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **303**, E308-21 (2012).
198. Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H. & Poirier, G. G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews. Cancer* **10**, 293–301 (2010).
199. Mohamed, J. S., Wilson, J. C., Myers, M. J., Sisson, K. J. & Alway, S. E. Dysregulation of SIRT-1 in aging mice increases skeletal muscle fatigue by a PARP-1-dependent mechanism. *Aging* **6**, 820–834 (2014).
200. Kirkland, J. B. Niacin requirements for genomic stability. *Mutation Research* **733**, 14–20 (2012).
201. Stephenson, L. and Kolka, M. Cardiovascular and thermoregulatory effects of niacin. *Thermal Physiology*, 279 (1989).
202. Wendt, D., van Loon, Luc J C & Lichtenbelt, Wouter D van Marken. Thermoregulation during exercise in the heat: strategies for maintaining health and performance. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **37**, 669–682 (2007).

203. Luo, Z. *et al.* TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1alpha upregulation in mice. *Cell Research* **22**, 551–564 (2012).
204. Ma, L., Lee, B. H., Clifton, H., Schaefer, S. & Zheng, J. Nicotinic acid is a common regulator of heat-sensing TRPV1-4 ion channels. *Scientific Reports* **5**, 8906 (2015).
205. Jones, T. E., Baar, K., Ojuka, E., Chen, M. & Holloszy, J. O. Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism* **284**, E96-101 (2003).
206. Tanner, C. J. *et al.* Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism* **282**, E1191-6 (2002).
207. Hickey, M. S. *et al.* Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *The American Journal of Physiology* **268**, E453-7 (1995).

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen von Februar 2013 bis Juli 2015 ausgeführt. Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Überlassung dieses Themas zur selbstständigen Bearbeitung sowie für die Unterstützung, die er meiner Arbeit zukommen ließ. Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie für ihre Hilfe bei der Laborarbeit und besonders Frauke Frank für ihr offenes Ohr. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. Robert Ringseis, der mir sowohl inhaltlich, als auch mit mentaler Unterstützung immer zur Seite stand. Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Dr. Aline Couturier und Frau Dr. Anja Fiesel für ihre freundschaftliche Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, für die unglaublich große finanzielle und mentale Unterstützung, für den uneingeschränkten Glauben an meine Fähigkeiten und an mein Durchhaltevermögen und vor allem für die Geduld - vielen herzlichen Dank also Mama, Bruno und Benjamin. Nicht unerwähnt bleiben sollen natürlich auch Helena, Arne, Iris, Andi, Sabrina, Theresa, Christina, Carmen und Vivian die mir in so vielen Dingen das Leben erleichtert haben. Ob mit der besten Gesellschaft, die man sich nur wünschen kann, mit unglaublich viel guter Laune, jeder Menge äußerst vorzüglichem Essen und lustigen Abenden, Korrekturlesen, Gesundmachen eines herzkranken Pferdes, organisatorischem und sonstigem Kümmern um die beiden Pferde oder mal wieder ausreichend Schlaf und Ausflügen auf der schönsten Insel der Welt! Einen nicht unerheblichen Teil des Weges hat mir auch mein Freund Marv leichter gemacht, vielen Dank für deine Unerschütterlichkeit und dafür, dass du einfach immer da warst! Ihr alle seid die Besten und ohne euch wäre das Ganze Unterfangen sicherlich nicht möglich gewesen.

Unbekannter Weise gilt mein Dank auch Astrid Lindgren, die mich schon in meiner Kindheit Dinge lehrte, die unvergessen geblieben sind:

„Lass dich nicht unterkriegen, sei frech und wild und wunderbar!“

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, ich habe diese vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den angegebenen Hilfen angefertigt. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, 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.

Eschenlohe, 14. September 2017

Anna Marie Kynast