

Anpassungsreaktionen an eine einmalige Laufbelastung und zwei unterschiedliche zehnwöchige Lauftrainingsprogramme im Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Pascal Herzog

Aus der Professur für Versuchstierkunde und Tierschutz

Betreuerin: Prof. Dr. Stephanie Krämer

und

dem Institut für Sportmedizin

des Medizinischen Universitätsklinikums Tübingen

Betreuerin: Prof. Dr. Barbara Munz

Anpassungsreaktionen an eine einmalige Laufbelastung und zwei unterschiedliche
zehnwöchige Lauftrainingsprogramme im Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Pascal Herzog

Tierarzt aus Stolberg

Gießen 2021

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. Stephanie Krämer

Prof. Dr. Barbara Munz

Prof. Dr. Christoph Rummel

Tag der Disputation: 08. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

Eigene Publikationen	113
1. Einleitung	1
1.1. Aufbau der Skelettmuskulatur	1
1.2. Körperliches Training und Anpassungsreaktionen der Skelettmuskulatur	2
1.2.1. Fasertyp-Switching	4
1.2.2. Modulatoren von Entzündungsprozessen	6
1.2.3. Metabolische Veränderungen	7
1.2.4. Muskelkatabolismus und -umbau	9
1.3. microRNA-Synthese	10
1.3.1. Transkription	10
1.3.2. Verarbeitung im Nukleus	10
1.3.3. Transport ins Zytoplasma	11
1.3.4. Zytoplasmatische Verarbeitung	11
1.4. Skelettmuskelspezifische miRNAs	13
1.5. Laufverhalten von Mäusen	13
1.6. Tierschutz im Sinne des 3R Prinzips	15
2. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
3.1.2. Primer	17
3.1.3. Kommerzielle Kits	19
3.1.4. Geräte	20
3.2. Methoden	20
3.2.1. Arbeit mit Versuchstieren	20
3.2.2. Molekularbiologische Methoden	23

3.2.3.	Analyse der qPCR Daten _____	26
4.	Ergebnisse _____	28
4.1.	<i>In vivo</i> -Versuche am Mausmodell _____	28
4.2.	Anpassungen des Skelettmuskels an eine einmalige Laufbelastung _____	28
4.2.1.	Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene _____	29
4.2.2.	Einfluss einer Laufbelastung auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im Skelettmuskel _____	45
4.3.	Anpassungen des Skelettmuskels an ein mehrwöchiges Laufbandtraining _____	51
4.3.1.	Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene _____	51
4.3.2.	Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im Skelettmuskel _____	62
4.4.	Anpassungen des Skelettmuskels an ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining _____	67
4.4.1.	Phänotypische Veränderungen im Versuch _____	67
4.4.2.	Laufleistung während des Versuchs _____	68
4.4.3.	Einfluss eines zehnwöchigen <i>ad libitum</i> -Laufbandtrainings auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene _____	72
4.4.4.	Einfluss eines zehnwöchigen <i>ad libitum</i> -Laufbandtrainings auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im Skelettmuskel _____	82
4.5.	Anpassungen des Skelettmuskels an ein zehnwöchiges Laufbandtraining und ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining: vergleichende Analyse _____	89
4.5.1.	Einflüsse auf die Expression von Genen, die mit Inflammation, Anti-Inflammation und zellulärem Stress assoziiert sind _____	90
4.5.2.	Einflüsse auf die Expression von Genen, die für metabolische und mitochondriale Marker kodieren _____	91
4.5.3.	Einflüsse auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren _____	92

4.5.4.	Einflüsse auf die Expression von Genen, die mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziiert sind _____	93
4.5.5.	Einflüsse auf die Expression von Genen, die für Faktoren kodieren, die an der miRNA-Biogenese beteiligt sind _____	93
4.5.6.	Einflüsse auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im Skelettmuskel _____	94
5.	Diskussion _____	96
5.1.	Anpassungseffekte an eine einmalige Laufbelastung _____	96
5.2.	Anpassungseffekte an ein zehnwöchiges Lauftraining _____	98
5.3.	Implementierung der Erkenntnisse im Hinblick auf das 3R-Prinzip _____	104
6.	Zusammenfassung _____	107
7.	Summary _____	110
8.	Danksagung _____	114
	Eidesstattliche Erklärung _____	115
	Literaturverzeichnis _____	116
	Tabellenverzeichnis _____	128
	Abbildungsverzeichnis _____	128

Abkürzungsverzeichnis

Actn3	Alpha-Actinin 3
Ago2	Argonaute-2
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Adenylat-Uridylat
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
CO	Kohlenstoffmonoxid
Cox4	Cytochrome c oxidase subunit 4
Ct	reshold cycle
Cxcl-5	Chemokine (cxc-motif) ligand 5
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
Dicer1	Dicer 1, Ribonuclease III
DNA	desoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
dsRBD	Doppelstrang-RNA-Bindungsdomäne
dsRNA	Doppelstrang-RNA
Ex	Exercise - Läufer
ftr	forced treadmill running - Laufbandtraining
fw	forward
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
Ho1	Hämoxygenase-1
Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
Il-6	Interleukin-6
Il-6-r	Il-6-Rezeptor
M. gastrocnemius	Musculus gastrocnemius - zweiköpfiger Wadenmuskel
M. tibialis anterior	Musculus tibialis anterior - vorderer Schienbeinmuskel
Maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma
MafF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (maf) oncogene homolog F
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mmu	Mus musculus - Hausmaus

mRNA _____ messenger RNA
 Mstn _____ Myostatin
 Murf1 _____ muscle ring-finger protein-1
 Myh1 _____ Myosin heavy chain polypeptide 1
 Myh2 _____ Myosin heavy chain polypeptide 2
 Myh7 _____ Myosin heavy chain polypeptide 7
 MyHC _____ Myosinschwerketten
 myomiRNA _____ muskelspezifische microRNA
 NCBI _____ National Center for Biotechnology Information
 NF- κ B _____ nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
 Nr4a3 _____ Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
 PCR _____ Polymerasekettenreaktion
 Pgc-1 α _____ Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha
 pre-miRNA _____ Vorläufer-miRNA
 pri-miRNA _____ primäre miRNA
 qPCR _____ quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion
 RAN _____ RAs-related Nuclear protein
 REST _____ Relative Expression Software Tool
 RISC _____ RNA-induzierter silencing-Komplex
 RLC _____ RISC-Beladungskomplex
 Rn18s _____ 18S ribosomal RNA
 RNA _____ ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
 RNase _____ Ribonuclease
 RNU6 _____ U6 small nucleic RNA
 ROS _____ reaktive Sauerstoffspezies
 Rps12 _____ Ribosomal protein S12
 rv _____ *reverse*
 Sed _____ Sedentary - Nicht-Läufer
 SNORD95 _____ Small Nucleolar RNA, C/D Box 95
 SNORD96a _____ Small Nucleolar RNA, C/D Box 96a
 ssRNA _____ Einzelstrang-RNA
 Tbp _____ TATA box binding protein
 TGF- β _____ Transforming growth factor beta
 TPA _____ (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)-inducible sequence-11

TTP _____ Tristetraprolin
Ucp3 _____ Uncoupling protein 3a
vwr _____ voluntary wheel running - Laufradtraining
Xpo5 _____ Exportin-5
Zfp36 _____ Zinc finger protein 36

1. Einleitung

1.1. Aufbau der Skelettmuskulatur

Etwa 55% der Körpermasse von Säugetieren entfällt auf die Skelettmuskulatur. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Fortbewegung, der Wärmeerzeugung in Zeiten von Kältestress und dem gesamten Stoffwechsel (Zierath & Hawley, 2004).

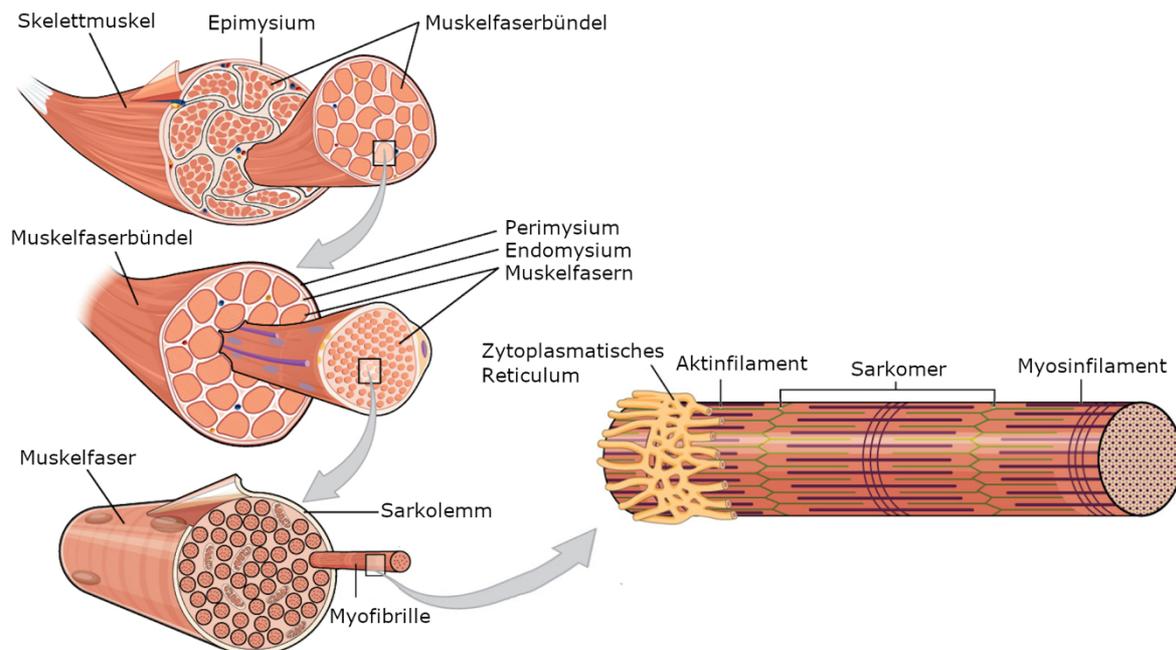


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Skelettmuskels

Einzelne Muskelfaserbündel werden vom Perimysium umgeben. Die Muskelfasern werden vom Endomysium bedeckt. Eine Skelettmuskelfaser ist von einer Plasmamembran, dem Sarkolemm, umgeben, die das Sarkoplasma, das Zytoplasma der Muskelzellen, enthält. Eine Muskelfaser besteht aus vielen Myofibrillen.

Abbildung modifiziert nach Betts et al., 2013

Die Skelettmuskulatur zeigt dabei eine bemerkenswerte Plastizität, indem sie sich an eine Vielzahl äußerer Reize anpassen kann (M. Flück & Hoppeler, 2003; Martin Flück et al., 2019; Hawley, 2002; Zierath & Hawley, 2004). Dieses Phänomen der Plastizität ist allen Wirbeltieren gemeinsam. Allerdings unterscheiden sich sowohl verschiedene Spezies und Arten, als auch Individuen einer Art, zum Teil deutlich in ihrer Fähigkeit der Anpassung. Dies erklärt zum Teil auch die deutlichen Unterschiede in Bezug auf die körperliche Leistungsfähigkeit, wie z. B. Ausdauer oder Kraft (Schiaffino & Reggiani, 2011).

Die kleinsten kontraktile Einheiten sind die Sarkomere. Diese bestehen unter anderem aus den beiden Proteinen Aktin und Myosin, welche sich zu Filamenten zusammenlagern. Während einer Kontraktion werden die Aktin- und Myosinfilamente

ineinander verschoben und das Sarkomer verkürzt sich. Aufgrund der besonderen Anordnung dieser Myofilamente erscheint der Skelettmuskel im Mikroskop quergestreift. Mehrere aneinandergereihte Sarkomere bilden die sogenannten Myofibrillen. Eine Muskelfaser, auch Myotube genannt, entsteht durch Fusionierung mehrerer spindelförmiger Myozyten. Diese differenzieren während der Embryonalentwicklung aus Myoblasten.

Ein entscheidender Faktor für die Regeneration und die daraus resultierende Hypertrophie des Muskels sind die Satellitenzellen. Sie liegen zwischen den Myotuben und können durch Proliferation aktive Myoblasten erzeugen. Diese Myoblasten wiederum können dann zu Myotuben differenzieren.

Das Endomysium, eine Bindegewebsschicht, umhüllt jede Myotube. Das Perimysium wiederum umgibt 20 bis 80 einzelne Muskelfasern. Mehrere dieser gebündelten Muskelfasern wiederum werden vom Epimysium und einer weiteren Bindegewebsschicht, der Faszie, umgeben und bilden zusammen den Skelettmuskel. Die Verbindung von Muskel und Knochen erfolgt über Sehnen (Betts et al., 2013; Clark et al., 2002; Lieber & Friden, 2001). Eine Übersicht zum Aufbau der Skelettmuskulatur findet sich in *Abbildung 1-1*.

1.2. Körperliches Training und Anpassungsreaktionen der Skelettmuskulatur

Sowohl die Muskelmasse als auch die Fasertypzusammensetzung sind individuell unterschiedlich und maßgeblich abhängig von den im Muskel ständig ablaufenden Auf- und Abbauprozessen. So können bestimmte Formen des körperlichen Trainings in einer Steigerung der Muskelmasse resultieren, während es aufgrund eines Hungerzustandes, im Alter oder bei chronischen Erkrankungen zu einer Abnahme der Skelettmuskelmasse kommen kann.

Die Plastizität, also das Anpassungsvermögen an unterschiedliche Bedingungen, ist entscheidend für die Funktion der Skelettmuskulatur. Die Isoformen der schweren Ketten des Myosins (MyHC) spielen eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der Muskelfunktion und -struktur (siehe Kapitel 1.2.1.). Ein oder mehrere Trainingsstimuli führen zunehmend zur Bildung oder zum Abbau bestimmter MyHC-Isoformen, was letztendlich zu Veränderungen des Fasertyps führt.

Generell ist die Plastizität einer einzelnen Skelettmuskelfaser durch eine spezifische Art der Prägung, die während der Embryonalentwicklung erfolgt und weitgehend genetisch determiniert ist, begrenzt. Allerdings ist das Muskelgewebe in der Lage, aufgrund äußerer

Reize die physiologischen Eigenschaften, den myogenen Stoffwechsel und die Größe der Myotuben anzupassen. Zusätzlich werden die Eigenschaften der Skelettmuskulatur durch etwaige Veränderungen der Nährstoffverfügbarkeit, der parakrinen/autokrinen Bedingungen und der intrazellulären Sauerstoffverfügbarkeit beeinflusst (Ferraro et al., 2014).

Training kann grob in zwei Kategorien unterteilt werden: Ausdauertraining und Krafttraining. Ausdauertraining, wie es z.B. von Marathonläufern, Schwimmern und Radfahrern ausgeführt wird, ist im Allgemeinen gekennzeichnet durch eine hohe Frequenz und lange Trainingsdauer. Ebenfalls charakteristisch ist dabei eine geringe Kraftaufbringung. Krafttraining wiederum, wie es z.B. von Bodybuildern vollzogen wird, ist durch eine niedrige Frequenz, hohen Widerstand, hohe Intensität und kurze Dauer gekennzeichnet (Nader & Esser, 2001).

Training bewirkt einen metabolischen und strukturellen Umbau der Skelettmuskulatur. Es führt so zu Veränderungen der kontraktilen Eigenschaften und zu einer erhöhten Angiogenese, um die Ermüdung der Muskeln zu reduzieren und ihre Leistungsfähigkeit zu verbessern (Booth & Thomason, 1991). Welche Anpassungen vorgenommen werden, hängt auch von der Art des ausgeübten Trainings ab: Krafttraining wirkt hauptsächlich durch die Zunahme von Muskelmasse und Kraft. Es führt zu einem Muskelfaserwachstum, das in erster Linie durch eine Erhöhung der kontraktilen Proteine gekennzeichnet ist. Ausdauertraining stimuliert die Expression von Genen, die für Komponenten der mitochondrialen Atmungskette kodieren, wodurch eine Anpassung hin zu einem stärker oxidativen Phänotyp erfolgt. Ausdauertraining mit geringer Intensität führt insgesamt zu Veränderungen in der Qualität des Muskelgewebes, hauptsächlich in Form von Strukturen, die die Sauerstoffversorgung und den Sauerstoffverbrauch unterstützen. Im Hinblick auf die kontraktilen Eigenschaften fördert Ausdauertraining die Transformation des Muskelfasertyps hin zu *slow-twitch*-Fasern, indem es eine Veränderung der Genexpression und der physiologischen Eigenschaften der Muskelfaser induziert. Der so beanspruchte Muskel muss häufig energieeffizienter arbeiten, was insbesondere durch langsamere MyHC-Typen erreicht wird (Gundersen, 2011). Ein Ausdauertraining kann damit hochintensiv sein, auch wenn es nicht zu einer Muskelhypertrophie führt. Ein Beispiel hierfür sind Marathonläufer, die zwar ein extrem intensives Trainingsregime durchführen, aber kaum Hypertrophie zeigen (Übersichten bei Hoppeler et al., 2011; Steinacker, 2002).

1.2.1. Fasertyp-Switching

Generell können im Skelettmuskel vier Fasertypen unterschieden werden: Typ-I, -IIa, -IIx und -IIb. In einem einzigen Muskel können aber durchaus auch mehrere Fasertypen vorkommen.

Typ-I-Fasern

Muskelfasern dieses Fasertyps zeichnen sich durch einen hohen Mitochondriengehalt und eine ausgeprägte Durchblutung aus. Die entsprechenden Muskelfasern werden auch als *slow-twitch*-Fasern bezeichnet. Sie sind durch eine langsamere Kontraktion mit einem überwiegend oxidativen Stoffwechsel charakterisiert. Dadurch sind sie vor allem für Ausdauereinheiten relevant und weisen eine gegenüber den schnelleren Fasertypen deutlich erhöhte Ermüdungsresistenz auf. Muskeln, die einen hohen Anteil an Typ-I-Fasern haben, zeigen eine rötliche Farbe und werden daher auch als „rote Fasern“ bezeichnet. Diese Farbe erhalten sie durch die hohe Myoglobinkonzentration. Myoglobin, welches strukturell dem Hämoglobin ähnelt, ist ein sauerstoffspeicherndes Protein. In Muskeln mit langsamen, sich häufig wiederholenden Bewegungen und Muskeln zur Gewährleistung der Körperstellung finden sich hauptsächlich Typ-I-Fasern.

Typ-II-Fasern

Typ-II-Fasern sind auch bekannt als *fast-twitch*-Fasern. Muskelfasern vom Typ-IIa zeichnen sich durch schnelle Kontraktionen und einen überwiegend oxidativen, zum Teil aber auch glykolytischen Stoffwechsel aus. Wie auch die Typ-I Fasern haben sie eine hohe Ermüdungsresistenz, sind aber eher für schnelle, sich wiederholende Bewegungsabläufe konzipiert.

Typ-IIx-Fasern haben einen geringen Gehalt an Mitochondrien, zeigen schnelle Kontraktionen und einen überwiegend glykolytischen Stoffwechsel. Sie haben einen geringen Gehalt an Myoglobin und weisen daher eine weiße Farbe auf. Man bezeichnet sie daher als „weiße Fasern“. Sie ermüden im Gegensatz zu den Typ-IIa-Fasern relativ schnell.

Eine Besonderheit existiert bei Nagern. Hier gibt es einen weiteren Typ der Typ-II-Fasern, nämlich Typ-IIb-Fasern. Diese Muskelfasern können am meisten Kraft und Leistung erbringen, kontrahieren sehr schnell und weisen aufgrund der geringen Mitochondrienzahl einen hauptsächlich glykolytischen Stoffwechsel auf. Die Konzentration an Myoglobin ist ebenfalls gering. Aufgrund der schnellen Kraftaufbringung in kürzester Zeit ermüden diese Fasern sehr schnell (Übersichten bei Augusto et al., 2004; Egan & Zierath, 2013; Schiaffino & Reggiani, 2011).

Fasertyp	-I	-IIa	-IIx (-IId)	-IIb
Vorkommen	alle Säuger	alle Säuger	alle Säuger	Nagetiere
Farbe	rot	rot	weiß	weiß
Vorherrschende MyHC-Isoform	MyHC-I (Myh7)	MyHC-IIa (Myh2)	MyHC-IIx/d (Myh1)	MyHC-IIb (Myh4)
Ermüdbarkeit	niedrig	mittel	hoch	sehr hoch
Kontraktionsgeschwindigkeit	langsam	schnell	schnell	sehr schnell
Oxidative Kapazität	hoch	mittel	niedrig	niedrig
Glykolytische Kapazität	niedrig	mittel	hoch	hoch
Mitochondrien- und Myoglobingehalt	hoch	mittel	niedrig	niedrig

Tabelle 1-1: Übersicht und Eigenschaften der verschiedenen Muskelfasertypen

Charakteristisch für die verschiedenen Skelettmuskelfasertypen sind die bereits erwähnten Myosinschwerkettenisoformen (*myosin heavy chain, MyHC*). Diese werden von den Genen *Myh1* bis *8* kodiert. Bei Myosinschwerketten handelt es sich um Motorproteine, welche mithilfe von ATP chemische Energie in mechanische Kraft umwandeln (Weiss et al., 1999). Die Isoformen der Myosinschwerketten bestimmen wesentlich die kontraktile Eigenschaften einer Muskelfaser und charakterisieren den Muskel somit (Steinacker, 2002). So enthält der Fasertyp-I vorwiegend *MyHC-I*, welches von *Myh7* kodiert wird, der Fasertyp-IIa *MyHC-IIa (Myh2)* und der Fasertyp-IIx/d insbesondere *MyHC-IIx/D (Myh1)* (Augusto et al., 2004). Innerhalb des Skelettmuskels kommt es dabei, je nach Funktionsanforderung und in Antwort auf eine Vielzahl von Signalen, zu einem Ein- bzw. Abbau spezifischer MyHC-Isoformen. Die Fasertypzusammensetzung eines bestimmten Muskels befindet sich dabei in einem dynamischen Zustand und passt sich ständig an die aktuellen Bedingungen an (Pette & Staron, 1997). Bei einem Ausdauertraining kommt es beispielsweise zu einem Umbau hin zu langsam kontrahierenden Typ-I-Fasern, in denen „langsame“ MyHC-Isoformen dominieren. Auf Schnellkraft sind dagegen vor allem Typ-II-Fasern mit „schnellen“ MyHC-Isoformen spezialisiert (Andersen et al., 1994). Während einem sogenannten Fasertyp-Switch ist es möglich, dass unterschiedliche Myosinschwerketten-Isoformen in ein und demselben Muskel nachgewiesen werden können. Man spricht dann von Hybridfasern (Brummer et al., 2013). In *Tabelle 1-1* sind die Eigenschaften der verschiedenen

Fasertypen dargestellt. Bei C57BL/6J-Mäusen konnte gezeigt werden, dass im *M. gastrocnemius* und *M. tibialis anterior* die IIa- und IIb-Isoformen überwiegen, die Typ-I-Isoform ist im *M. gastrocnemius* ebenfalls deutlich nachweisbar vertreten (Augusto et al., 2004).

Alpha-Actinin 3, welches durch das *Actn3*-Gen kodiert wird, ist in die Kontraktion der Skelettmuskulatur involviert. Es sorgt für die notwendige Stabilität der Aktinfilamente, indem es die Verbindung des Strukturproteins Aktin mit anderen Proteinen herstellt. *Actn3* ist ausschließlich in schnell kontrahierenden Muskelfasern (Typ-IIx) exprimiert. Ein Mangel an *Actn3* wirkt sich vor allem bei kurzen Belastungen, wie Sprints und Krafttraining, nachteilig auf die Muskelfunktion aus (North et al., 1999; Pickering & Kiely, 2017).

1.2.2. Modulatoren von Entzündungsprozessen

Interleukin-6 (Il-6)

Il-6, ein proinflammatorisches Zytokin, wird von Zellen des Immunsystems, aber auch von Skelettmuskelzellen sezerniert (Ostrowski et al., 1998). In Reaktion auf körperliche Arbeit nimmt die Il-6-Konzentration in der Zirkulation zu (Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000) und kann bis zum Zehnfachen des Ruhewertes ansteigen (Pedersen et al., 2001). Die Intensität und vor allem die Dauer der Belastung beeinflussen dabei maßgeblich die Il-6-Reaktion (Fischer, 2006).

Il-6-Rezeptor (Il-6-r)

Der Il-6-Rezeptor liegt entweder als membrangebundene oder als lösliche Variante vor. Hieran bindet Il-6 mit dem Co-Rezeptor Glycoprotein 130 (gp130) und setzt so die weitere Signaltransduktion in Gang (Baran et al., 2018; Mihara et al., 2012). In Reaktion auf eine akute Belastung steigt der Il-6-r-mRNA-Spiegel an. Auch nach einem zehnwöchigen Training liegt im Skelettmuskel ein höherer Il-6-r-mRNA-Spiegel im Vergleich zu vor dem Training vor (Keller et al., 2005).

Chemokine (cxc-motif) ligand 5 (Cxcl-5)

Cxcl-5 reguliert die Homöostase der neutrophilen Granulozyten und stimuliert die Chemotaxis von Leukozyten (Craig et al., 2009). Hohe Cxcl-5-Konzentrationen werden bei traumatischen Verletzungen und in Antwort auf körperliches Training gemessen (Jergenson et al., 2015).

Zinc finger protein 36 (Zfp36)

Zfp36, auch bekannt als Tristetraprolin (*TTP*), ist ein RNA-bindendes Protein. Das entsprechende Gen wurde ursprünglich als *TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)-inducible sequence-11* kloniert. Gleichzeitig wurde *Zfp36* als ein Gen identifiziert, welches in Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Insulinbehandlung von Zellen verstärkt exprimiert wird (Lai et al., 1990; Varnum et al., 1991). *Zfp36* ist in der Lage, eine Inflammationsreaktion zu supprimieren. Dazu bindet es vor allem an AU-reiche Elemente, die sich vermehrt in Transkripten befinden, die für Entzündungsmediatoren kodieren (Bakheet et al., 2001). Aufgrund dieser Bindung wird anschließend durch *Zfp36* der Abbau der entsprechenden Transkripte eingeleitet. Daher könnte *Zfp36* auch bei der Steuerung der myogenen Entzündungsantwort eine entscheidende Rolle spielen. (Beiter et al., 2015).

Hämoxygenase-1 (Ho1)

Ho1 ist ein antioxidatives Stressprotein. Die Expression des entsprechenden Gens wird durch reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*), Zytokine und Hyperthermie induziert (Niess et al., 1999). Im Skelettmuskel wird die *Ho1*-Expression durch körperliche Aktivität und elektrische Stimulation induziert (Vesely et al., 1998). *Ho1* baut die Hämgruppe zu Biliverdin ab und setzt dabei Eisen und Kohlenstoffmonoxid (*CO*) frei. Häm ist im Skelettmuskel reichlich vorhanden, beispielsweise in Myoglobin und den mitochondrialen Cytochromen (Chan et al., 2016). Bei Sportlern konnte eine Repression der *Ho1*-Basisexpression beobachtet werden, was als ein Anpassungsmechanismus an regelmäßiges körperliches Training gesehen wird (Niess et al., 1999).

v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (maf) oncogene homolog F (MafF)

MafF gehört zu den kleinen Maf-Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle als entscheidende Regulatoren der Stress-Signalantwort spielen (Neubauer et al., 2014). Auch bei Krankheiten wie Diabetes oder Tumorerkrankungen und neuronalen Störungen sind kleine Maf-Proteine in die transkriptionelle Kontrolle eingebunden (Kannan et al., 2012). Es konnte zudem eine erhöhte Expression der entsprechenden Gene im Skelettmuskel unter Training festgestellt werden (Popov et al., 2017).

1.2.3. Metabolische Veränderungen

Aufgrund von Ausdauertraining kommt es zur Ausbildung eines überwiegend oxidativen Muskelfasertypus. Hierbei steigt vor allem die Anzahl an Mitochondrien und die Vaskularisierung nimmt zu (M. Flück & Hoppeler, 2003; Hoppeler et al., 2011). Die Veränderungen sind vor allem metabolischer Art. Es kommt hauptsächlich zu einer

veränderten Genexpression für Transport- und Membranproteine und Enzyme des Citratzyklus und der Atmungskette.

Uncoupling protein 3a (Ucp3)

Das für Ucp3 kodierende Gen wird hauptsächlich in Mitochondrien der Skelettmuskulatur exprimiert. Als mitochondriales Membranprotein entkoppelt Ucp3 die ATP-Produktion von der Atmungskette. Ucp3 spielt daher vor allem unter körperlicher Anstrengung eine Rolle, da es in Energiemangelsituationen zu einer Veränderung des metabolischen Stoffwechsels führt. Zusätzlich scheint Ucp3 die Mitochondrien vor oxidativem Stress zu schützen (Nabben & Hoeks, 2008; Zhou et al., 2000).

Cytochrome c oxidase subunit 4 (Cox4)

Cox4 ist Teil eines Enzymkomplexes mit mehreren Untereinheiten, der den Transfer von Elektronen von Cytochrom c zu molekularem Sauerstoff vermittelt und somit zur Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran beiträgt (Abu-Libdeh et al., 2017; Vogt et al., 2018). Unter Trainingsbedingungen wird *Cox4* vermehrt exprimiert und kann somit als Marker für Muskelanpassung genutzt werden (Sylviana et al., 2019).

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha (Pgc-1 α)

Mehrere Signaltransduktionskaskaden konvergieren auf dem Transkriptions-Co-Aktivatoren Pgc-1 α (Hoppeler et al., 2011), der als Koordinator für einen Großteil der Transkriptions- und Posttranskriptionsprozesse verantwortlich ist. Pgc-1 α selbst ist kein Transkriptionsfaktor, sondern fungiert lediglich als transkriptioneller Koaktivator. Pgc-1 α interagiert mit einer wachsenden Liste von Transkriptionsfaktoren sowie kernständigen Rezeptoren und aktiviert diese (Lira et al., 2010). Folglich ist das Protein an der Regulation von kern- und mitochondrial-kodierten Genen beteiligt, die für Anpassungsreaktionen im Skelettmuskel erforderlich sind, insbesondere auch in Zusammenhang mit Ausdauertraining (Puigserver & Spiegelman, 2003; Scarpulla, 2008; Wende et al., 2007). Dies führt vor allem zu Fasertyp-Transformation, mitochondrialer Biogenese, Angiogenese und anderen Veränderungen in der Skelettmuskulatur, gemeinsam mit metabolischen Anpassungen (Chinsomboon et al., 2009; Goodpaster et al., 2003; Schiaffino et al., 2007). Aktuelle Ergebnisse legen nahe, dass Pgc-1 α für einige dieser Anpassungsreaktionen eine Schlüsselrolle spielt (Lira et al., 2010). Die Expression des *Pgc-1 α* -Gens ist bei den verschiedenen Typen von Muskelfasern unterschiedlich: Beispielsweise findet sich eine erhöhte Expression in den Typ-I-Muskelfasern (z.B. *M. soleus*) und eine geringere Expression in Muskelfasern des Typs II (z.B. *M. tibialis*

anterior). Darüber hinaus spielt Pgc-1 α eine wichtige Rolle bei der Transformation einzelner Muskelfasertypen ineinander, dem sogenannten *fiber type switch* (Rasbach et al., 2010; L. Zhang et al., 2017).

Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3 (Nr4a3)

Nr4a3 gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren und reguliert die Skelettmuskelphysiologie und -stoffwechselfunktion (Goode et al., 2016; Pearen & Muscat, 2012). Zudem wurde Nr4a3 mit der Regulierung der Belastungsausdauer und der Remodellierung von Skelettmuskelfasern in Verbindung gebracht (Goode et al., 2016). In Studien konnte gezeigt werden, dass ein Training die Nr4a3-mRNA-Konzentrationen im Muskel in Abhängigkeit vom Calcium/Calcineurin-Signaltransduktionsweg erhöht (Kawasaki et al., 2011; Kupr et al., 2017; Pattamaprapanont et al., 2016).

1.2.4. Muskelkatabolismus und -umbau

Myostatin (Mstn)

Mstn ist Mitglied der TGF- β -Familie von Wachstumsfaktoren und ein negativer Regulator der Skelettmuskelmasse. Das entsprechende Gen wird vorwiegend im Skelettmuskel exprimiert (S.-J. Lee, 2004; McPherron et al., 1997; Patel & Amthor, 2005; Savage & McPherron, 2010). Bereits 1997 konnten Myostatin-*knockout*-Mäuse generiert werden, bei denen es sowohl durch Hypertrophie als auch Hyperplasie zu einer abnormen Zunahme an Muskelmasse kommt (McPherron et al., 1997).

Myostatin ist ein Skelettmuskel-Myokin und seine aktive Form bindet an den Typ 2B-Aktivinrezeptor am Skelettmuskel (Butcher et al., 2017). Der *Myostatin*-Promotor, über den die Expression des *Mstn*-Gens gesteuert wird, enthält zudem NF- κ B-Bindungsstellen (Ma et al., 2001).

muscle ring-finger protein-1 (Murf1)

Murf1 gehört zu den E3-Ubiquitin-Ligasen. Das entsprechende Gen wird im Herz- und Skelettmuskel exprimiert (Spencer et al., 2000). Murf1 ist sowohl an der M-Linie des Sarkomers als auch an den Z-Scheiben lokalisiert (Bodine & Baehr, 2014; Centner et al., 2001). In neueren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Murf1-mRNA-Spiegel bei Muskelatrophie zwar rasch ansteigen, was darauf hindeutet, dass das Protein zur Initiierung der Atrophie beitragen könnte, die primäre Rolle von Murf1 aber vermutlich nicht darin besteht, Muskelatrophie zu verstärken. Es ist anzunehmen, dass das Protein eine zusätzliche Rolle im Skelettmuskel spielt und möglicherweise

Muskelumbauprozesse und die metabolische Aktivität des Muskels steuert (Foletta et al., 2011).

1.3. microRNA-Synthese

microRNAs (miRNAs) sind definiert als Einzelstrang-RNAs (ssRNAs) mit 21–25-Nukleotiden Länge, die aus haarnadelförmigen Vorläufern hergestellt werden (Ambros et al., 2003; Wahid et al., 2010). In den letzten Jahren rückten miRNAs und ihre Synthese immer weiter in den Fokus der Forschung.

Bei Tieren werden Gene für miRNAs in eine primäre miRNA (pri-miRNA) transkribiert. Die pri-miRNA wird innerhalb des Kerns vom Mikroprozessorkomplex zu einer Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) verarbeitet. Als nächstes wird der Transport von pre-miRNAs zum Zytoplasma durch Exportin-5 (Xpo5) vermittelt. Im Zytoplasma werden sie von Dicer1, einem Protein vom Typ RNase III, zu reifen miRNAs weiterverarbeitet. Nachfolgend werden diese Schritte beschrieben.

1.3.1. Transkription

Die RNA-Polymerase II ist hauptsächlich für die Transkription von miRNA-Genen verantwortlich (Y. Lee et al., 2004; Wahid et al., 2010), in manchen Fällen kann jedoch auch die RNA-Polymerase III diese Funktion übernehmen (Borchert et al., 2006). Die Polymerase II-abhängige miRNA-Genexpression ermöglicht eine zeitliche Kontrolle, so dass unter bestimmten Bedingungen und bei bestimmten Zelltypen eine spezifische Gruppe von miRNAs synthetisiert werden kann. Das Produkt der Transkription ist als primäre miRNA (pri-miRNA) bekannt, die normalerweise mehrere Kilobasen lang ist (Wahid et al., 2010). Dieses Primärtranskript trägt den üblichen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende sowie ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende, ist doppelsträngig und lagert sich zu einer Schleife, als sogenannte Haarnadelstruktur, zusammen (Okamura & Lai, 2008). Die entstandene pri-miRNA kann dabei sowohl für eine einzelne als auch für mehrere *mature* miRNAs codieren.

1.3.2. Verarbeitung im Nukleus

Diverse Proteine haben Teil an der miRNA-Prozessierung. Bei allen Tieren beginnt die Verarbeitung zunächst im Nukleus, dem Zellkern. Nachdem die pri-miRNA mithilfe der RNA-Polymerase II transkribiert worden ist, wird sie etwa 11 Basenpaare vom ssRNA-Stamm der Haarnadelstruktur entfernt gespalten. Dadurch wird eine Haarnadelstruktur von ca. 60–70 Nukleotiden Länge freigesetzt, die als Vorläufer-miRNA (pre-miRNA)

bezeichnet wird (Y. Lee et al., 2002; Zeng & Cullen, 2003). Dieser Verarbeitungsschritt wird vom Microprozessorkomplex, bestehend aus der Endoribonuklease Drosha, einem Mitglied der Ribonuklease III-Familie, und dem Cofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) (Y. Lee et al., 2003) durchgeführt. DGCR8 bindet direkt und stabil an pri-miRNAs, wobei die dsRNA-Bindungsdomänen (dsRBDs) in DGCR8 für die Erkennung deren doppelsträngiger RNAs verantwortlich sind (Yeom et al., 2006). DGCR8 fungiert für Drosha als Führung zum Schneiden der pri-miRNA (Okada et al., 2009). Durch eine verminderte *DGCR8*-Expression kommt es zu einer Anhäufung von pri-miRNAs im Nucleus und in Folge zu einer Reduktion reifer miRNAs (Denli et al., 2004). Unter Stressbedingungen scheint es zu einer verminderten Interaktion von Drosha mit DGCR8 zu kommen, was wiederum zum Abbau von Drosha führt und den Zelltod unter Stressbedingungen fördert (Yang et al., 2015).

1.3.3. Transport ins Zytoplasma

Pre-miRNAs werden in das Zytoplasma transportiert, um zu maturen, d.h. reifen, miRNAs zu werden. Der Transport der pre-miRNAs erfolgt dabei über in die Kernmembran eingebettete Proteinkanäle (Wahid et al., 2010), bei denen es sich in diesem Fall um den nukleären Transportrezeptor Exportin-5 (Xpo5) handelt (Lund et al., 2004). Xpo5 ist ein RanGTP-abhängiger Transportrezeptor, d.h. es handelt sich hierbei um einen GTP-abhängigen Mechanismus (Kim et al., 2009; Siomi & Siomi, 2010).

Es wird davon ausgegangen, dass der Export von pre-miRNAs aus dem Nucleus initiiert wird, wenn Xpo5 die >14-bp doppelsträngige RNA (ds-RNA) der Stamm-Schleife mit einem 3'-Überhang erkennt. Im Zellkern folgt eine kooperative Bindung sowohl an die entsprechende pre-miRNA, als auch an den GTP-gebundenen Cofaktor RAN (Kim et al., 2009; Siomi & Siomi, 2010). Die an Xpo5 gebundene pre-miRNA wird aus dem Kern exportiert, wo die Hydrolyse des GTP zu ihrer Freisetzung führt (Lund et al., 2004; Wahid et al., 2010; K. Wu et al., 2018). Aufgrund seiner Struktur scheint Xpo5 zudem pre-miRNA-Moleküle vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen (Okada et al., 2009)

1.3.4. Zytoplasmatische Verarbeitung

Die pre-miRNA wird im Zytoplasma freigesetzt und anschließend von Dicer1, einer zytoplasmatischen Ribonuklease, zu einer maturen miRNA verarbeitet (Papachristou et al., 2011).

Dicer1 ist ein hochspezifisches Enzym, das an einer bestimmten Stelle, etwa 22 Nukleotide vom bereits vorhandenen Terminus der pre-miRNA, ansetzt und die pre-miRNA-Haarnadel auf ihre reife Länge kürzt bzw. spaltet. Es entsteht ein miRNA-Duplex, bestehend aus dem *passenger*-Strang (miRNA*) und dem funktionellen Strang als *mature* miRNA. Meist wird der *passenger*-Strang abgebaut. Dicer1 arbeitet eng mit anderen Proteinen zusammen, darunter die Proteine der Argonauten-Familie (Ago2) (Carmell et al., 2002).

Der funktionelle Strang wird als *mature* miRNA zusammen mit Ago2 in den RNA-induzierten *silencing*-Komplex (RISC) geladen. Der so gebildete RISC-Beladungskomplex (RLC) wird nun durch die *mature* miRNA zu seiner Ziel-mRNA geführt, die durch mRNA-Spaltung, translationale oder transkriptionelle Repression oder Deadenylierung zum „*silencing*“ gebracht wird (Polakovičová et al., 2016; Wahid et al., 2010; H. Wu et al., 2018).

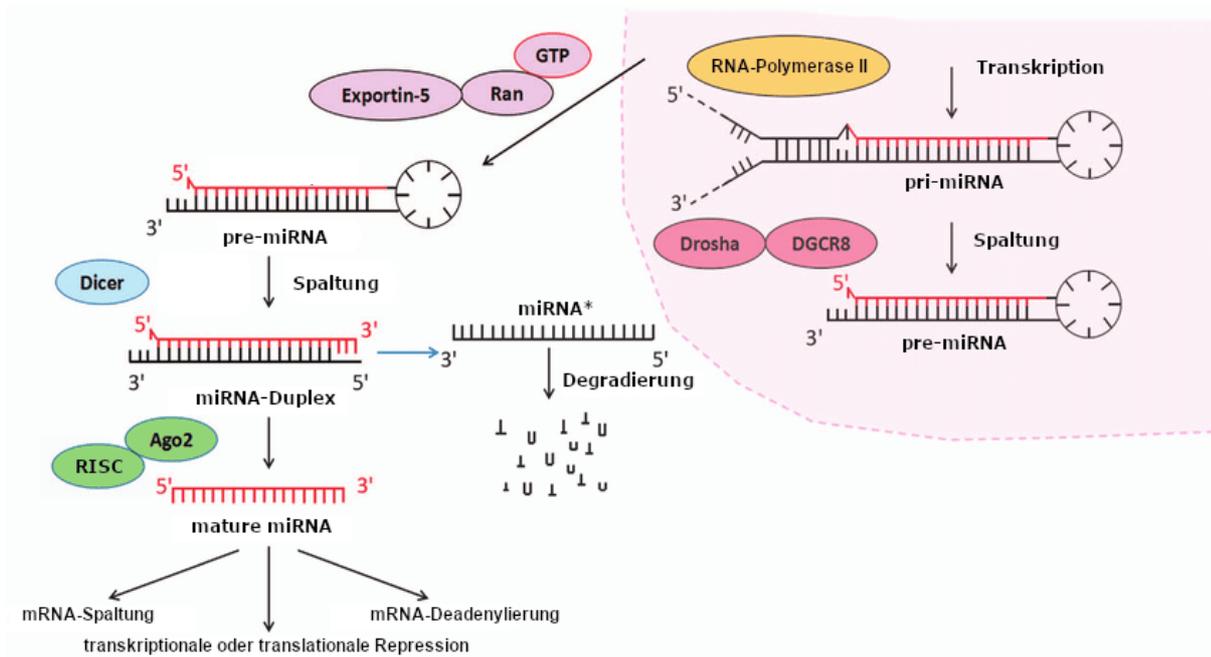


Abbildung 1-2: miRNA Reifung innerhalb der Zelle

Die Reifung der miRNAs umfasst die Produktion des primären miRNA-Transkripts (pri-miRNA) und die Spaltung der pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex Drosha-DGCR8 im Zellkern. Dann wird die pri-miRNA durch Exportin-5-Ran-GTP aus dem Zellkern exportiert. Im Zytoplasma spaltet Dicer1 die pre-miRNA zu ihrer reifen Länge.

Abbildung modifiziert nach H. Wu et al., 2018

Die Nukleotide 2-8 der miRNAs sind besonders wichtig für die Paarung mit der Ziel-mRNA. Diese Sequenz wird als miRNA-Kernsequenz bezeichnet und ist häufig der

primäre Faktor der Zielerkennung. Einzelne miRNAs können bis zu 100 verschiedene mRNAs als Ziel haben, da die meisten Zielstellen auf den mRNAs nur teilweise komplementär zu ihren passenden miRNAs sind (Bartel, 2009). Ebenso kann eine einzelne mRNA mehrere Bindungsstellen für verschiedene miRNAs umfassen. Dieser Umstand führt zu einem komplexen regulatorischen Netzwerk. Unter Berücksichtigung dieser Wirkungsweise ist es gut vorstellbar, dass die überwiegende Mehrheit der zellulären und extrazellulären Funktionen direkt oder indirekt durch miRNAs reguliert wird (Pasquinelli, 2012).

1.4. Skelettmuskelspezifische miRNAs

Neben der Entdeckung, dass miRNAs phylogenetisch konserviert sind, konnte zudem festgestellt werden, dass einige miRNA-Gene gewebespezifisch exprimiert werden. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass *miR-1* nicht in Gehirn-, Nieren-, Leber- oder Lungenzellen exprimiert wird (Lagos-Quintana et al., 2001; R. C. Lee & Ambros, 2001). Sempere et al. (2004) konnten erstmalig zeigen, dass *miR-1*, *miR-133a* und *miR-206* spezifisch in Zellen der Skelettmuskulatur zu finden sind. Für diese miRNAs wurde der Begriff „*myomiRNAs*“ geprägt (McCarthy, 2008, 2011; Sempere et al., 2004; Winbanks et al., 2014). Die *myomiR*-Familie wurde alsbald um *miR-208a*, *miR-208b* und *miR-499* erweitert (van Rooij et al., 2009; Van Rooij et al., 2007). Die meisten Mitglieder der *myomiR*-Familie sind sowohl im Herzen als auch im Skelettmuskel nachweisbar, mit Ausnahme von *miR-208a*, welche für das Herz, und *miR-206*, die für den Skelettmuskel spezifisch ist (McCarthy, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl anderer miRNAs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Plastizität der Skelettmuskulatur spielt, ohne dass sie exklusiv in Zellen der Muskulatur zu finden sind (Horak et al., 2016; McCarthy, 2011).

1.5. Laufverhalten von Mäusen

Wenn Mäuse Zugang zu Laufrädern erhalten, laufen sie spontan über eine Gesamtstrecke von 4 bis 20 km pro Tag und zeigen eine Gesamtaktivitätszeit von 3 bis 7 Stunden pro Tag (Manzanares et al., 2018). Die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit beträgt dabei 1,3 km/h, die maximale Laufgeschwindigkeit 5,7 km/h (Meijer & Robbers, 2014).

In einem Feldversuch von Johanna H. Meijer und Yuri Robbers über einen Zeitraum von mehreren Jahren konnte die Nutzung von Laufrädern durch Wildtiere, vor allem auch Mäuse, im gesamten Jahresverlauf sowohl im Stadtgebiet als auch in der Natur

beobachtet werden (Meijer & Robbers, 2014). Sie platzierten dazu ein Laufrad mit einem Durchmesser von 24 cm mit automatischer Bewegungserkennung, einem passiven Infrarot-Bewegungssensor, einer Nachtsichtkamera und Futter, um Wildtiere anzulocken, an geeigneten Stellen. Um die Messgeräte unterzubringen, war das Rad Teil einer käfigartigen Konstruktion, die von jedem Tier bis zur Größe einer Ratte ohne Probleme betreten werden konnte. Interessant ist dabei vor allem, dass die Verwendung eines Laufrads von Tieren auch ohne eine damit verbundene Futterbelohnung als lohnend empfunden werden kann. Dazu gaben Meijer und Robbers über ein Jahr lang kein Futter mehr in die Laufrad-Konstruktionen, welche trotzdem von den Tieren benutzt wurden. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass das freiwillige Laufen in Laufrädern den Spiel-, Flucht- oder Bewegungstrieb zu befriedigen scheint. Es handelt sich somit um ein selbstbelohnendes und nicht um ein stereotypes Verhalten. Stereotype Verhaltensweisen können aus der Beschränkung durch die Umwelt resultieren und haben keinerlei Ziel oder Funktion (Banjanin & Mrosovsky, 2000; Garland et al., 2011; Meijer & Robbers, 2014).

Zu allen Zeiten und unter allen Bedingungen erbrachten die Mäuse eine hohe Geschwindigkeit und nutzten das Rad niemals in langsamem Tempo, was ihrem natürlichen Verhalten, das eher „Sprintern“ als „Dauerläufern“ ähnelt, entspricht. Ein Vergleich zwischen Labor und Wildbahn hinsichtlich der zurückgelegten Strecke wird jedoch dadurch erschwert, dass die Wildmäuse den Großteil ihrer Bewegung außerhalb des Rades absolvieren (Krebs et al., 1994; Mason et al., 2007). Das Laufverhalten im Labor ist ebenfalls sehr variabel, abhängig von z.B. dem Alter der Tiere, dem Durchmesser des Rades, der Rotationsreibung des Rades und der Größe des Käfigs (Hill, 1958; Krebs et al., 1994; Mason et al., 2007).

Allerdings ist bisher wenig dazu bekannt, welche physiologischen und molekularen Anpassungsreaktionen unterschiedliche Formen der körperlichen Belastung und des Trainings in Mäusen induzieren. Eine genauere Kenntnis dieser Prozesse könnte zum einen dazu beitragen, besser zu verstehen, inwieweit in murinen Modellsystemen gewonnene Daten auf entsprechende klinische, insbesondere sportmedizinische Fragestellungen beim Menschen übertragbar sind, zum anderen ließen sich Erkenntnisse dazu ableiten, wie ein Bewegungskonzept für Labortiere gestaltet werden könnte, um einen maximal positiven Effekt auf die Gesundheit und das Wohlbefinden der Tiere zu haben.

1.6. Tierschutz im Sinne des 3R Prinzips

Das 3R Prinzip (Replacement, Reduction and Refinement, also Ersatz, Reduktion und Verfeinerung) wurde vor 50 Jahren entwickelt und bietet einen Rahmen für eine humanere Tierforschung.

Gründungsväter dieser Philosophie waren dabei 1959 die britischen Wissenschaftler William Russel und Rex Burch. Sie sahen das Prinzip der 3R als ein Grundsatz der experimentellen wissenschaftlichen Arbeit an und veröffentlichten dies in dem Buch „The Principles of Humane Experimental Technique“ (W. M. S. Russell & Burch, 1959).

Das Bundesministerium für Risikobewertung schreibt dazu: „Ziel des 3R Prinzips ist es, Tierversuche vollständig zu vermeiden (Replacement) und die Zahl der Tiere (Reduction) und ihr Leiden (Refinement) in Versuchen auf das unerlässliche Maß zu beschränken.“ (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2020).

Mäuse zeigen eine große Variabilität an natürlichen Verhaltensweisen. Dazu gehören Laufen, Wühlen, Nahrungssuche, Nagen und Nestbau. Diese Verhaltensweisen sind für das Wohlbefinden von entscheidender Bedeutung. Wenn sie daran gehindert werden, ihren natürlichen Neigungen zu folgen, kann dies zu übermäßigem Stress führen, der sich möglicherweise auf ihre Gesundheit auswirkt und die stressbedingten Hormonspiegel erhöht (Clipperton-Allen & Page, 2015). Aufgrund der Wichtigkeit für die Erhaltung der Gesundheit und des Wohlbefindens ist die Bereitstellung eines oder mehrerer Bereicherungsgegenstände heutzutage nahezu obligatorisch. Zu diesen Gegenständen gehören Laufräder, Häuser, Röhren, Nestbaumaterial oder auch benagbare Spielzeuge (Bailoo et al., 2018).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit, in der das Laufverhalten und die Anpassungsreaktionen an ein Lauftraining untersucht wurden, ist somit vor allem das dritte R – Refinement – interessant. Darunter versteht man Methoden, die das Leiden der Tiere minimieren und das Wohlbefinden verbessern sollen. Ziel ist ein besseres Verständnis der Auswirkungen des Tierschutzes auf die wissenschaftlichen Ergebnisse.

2. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Für diese Arbeit ergaben sich die nachfolgend dargestellten Fragen.

1. Wie verändert sich die Expression verschiedener Trainingsmarker und *myomiRs* in Antwort auf eine akute Laufbelastung?

Um diese Frage zu klären, sollten verschiedene Trainingsmarker in Skelettmuskelproben von Mäusen bestimmt werden, die einer einmaligen, akuten Laufbelastung unterzogen worden waren. Die Analyse sollte im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Belastung erfolgen.

2. Wie verändert sich die Expression verschiedener Trainingsmarker und *myomiRs* in Antwort auf ein zehnwöchiges, chronisches Lauftraining?

Um diese Frage zu klären, sollten verschiedene Trainingsmarker in Skelettmuskelproben von Mäusen bestimmt werden, die ein mehrwöchiges, regelmäßiges Lauftraining auf einem Laufband oder auf einem Laufrad absolviert hatten. Die Analyse sollte im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Belastung erfolgen.

3. In welchem Maße unterscheiden sich die Effekte eines mehrwöchigen, chronischen Laufband- und eines mehrwöchigen, chronischen Laufradtrainings?

4. Wie lässt sich eine Verbesserung der Lebensbedingungen für Versuchstiere im Sinne des Tierwohls nach dem 3R-Prinzip aus den Ergebnissen ableiten?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

BeadBug <i>Tubes</i>	Merck KGaA, Darmstadt
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Corning Incorporated, Corning, USA
Ethanol 99,8% AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol 96% AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopentan	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoboxen, Pappe	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Kryoröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Methanol AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
nukleasefreies Wasser	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl 200 µl, 1000 µl)	Qiagen GmbH, Hilden
Precellys Homogenizers	Sarstedt, Nümbrecht
RNase AWAY	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Qiashredder	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RNAlater	Qiagen GmbH, Hilden
Semi-skirted 96-well PCR Plate, 0, 2 ml	Ambion GmbH, Kaufungen
SsoFast EvaGreen Supermix	Thermo Fisher Scientific, Ulm
SUGRU® Mouldable Glue	Bio-RAD Laboratories GmbH, München
Wasser demineralisiert, nicht keimfrei	FormFormForm Limited, London, Großbritannien
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2. Primer

Material und Methoden

Alle unten aufgeführten Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Standort Ebersberg) bezogen:

Gensymbol	Genname	NCBI Reference Sequence	Primer-Sequenz (5'-3')	Größe des Amplicons
<i>Actn3</i>	<i>Alpha-Actinin 3</i>	NM_013456.2	fw: CCCTCAGTTCGCAGGACATC rv: CCAGCTCCTCCTGCAGTGTC	87 bp
<i>Cox4l1</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4l1</i>	NM_009941.3	fw: CGCTCGTTCTGATTTGGGAG rv: GGCCTTCATGTCCAGCATTTC	107 bp
<i>Cxcl5</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>	NM_009141.3	fw: GCCCTACGGTGGAAAGTCATAGC rv: AACACTGGCCGTTCTTTCCAC	158 bp
<i>Dgcr8</i>	<i>Dgcr8, microprocessor complex subunit</i>	NM_033324.2	fw: GGCGCCACAGGTGGAA rv: TACACACTGGCGGCTTAGTC	176 bp
<i>Dicer1</i>	<i>Double-stranded RNA-specific endoribonuclease</i>	NM_148948.2	fw: CTGAGCTTAGGAGATCCGAGG rv: CTTCCACGGTGACTCTGACC	291 bp
<i>Drosha</i>	<i>Drosha, Ribonuclease type III</i>	NM_00113014.9.1	fw: TCTCTGTAGAGACTGTGAATCCTG rv: GCTACATCTTCCGCTCACGA	140 bp
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	NM_00128972.6.1	fw: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA rv: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	150 bp
<i>Hmox1</i>	<i>Heme oxygenase 1</i>	NM_010442.2	fw: AGGCTAAGACCGCCTTCCTG rv: AGCAGGCCTCTGACGAAGTG	119 bp
<i>Hprt</i>	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>	NM_013556.2	fw: AGTACAGCCCCAAAATGGTTAAG rv: CACAAACGTGATTCAAATCCCTG	165 bp
<i>Il-6</i>	<i>Interleukin 6</i>	NM_031168.2	fw: CAACGATGATGCACTTGCAGA rv: TGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA	129 bp
<i>Il-6r</i>	<i>Interleukin 6 receptor</i>	NM_010559.3	fw: CTGCCACATTCCTGGTAGC rv: TGGAGGAGAGGTCGTCTTGC	129 bp
<i>MafF</i>	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)</i>	NM_010755.4	fw: GTCTCCAGCCCAGAGGTCATC rv: CAACTCGCGCTTGACCTTCAG	82 bp
<i>Mstn</i>	<i>Myostatin</i>	NM_010834.3	fw: AACCTTCCCAGGACCAGGAG rv: TCGCAGTCAAGCCCCAAGTC	102 bp
<i>Murf1 (Trim63)</i>	<i>Muscle ring-finger protein-1, Tripartite motif-containing 63</i>	NM_00103904.8.2	fw: TCCTGCAGAGTGACCAAGGAG rv: GCAGCTCGCTCTTCTTCTCG	103 bp
<i>Myh1</i>	<i>Myosin heavy chain polypeptide 1, skeletal muscle, adult</i>	NM_030679.1	fw: GGCTCCAGGACCTTGTGGAC rv: GCTGGATCTTGCGGAATTTG	114 bp
<i>Myh2</i>	<i>Myosin, heavy chain polypeptide 2, skeletal muscle, adult</i>	NM_00103954.5.2	fw: TCGTTTGCCAGTAAGGGTCTG rv: CTCGATTGCTCCTTTTTCGG	113 bp

<i>Myh7</i>	<i>Myosin, heavy chain polypeptide 7, cardiac muscle, beta</i>	NM_080728.2	fw: AGCGCAATGCAGAGTCAGTG rv: GCAGCCGCAGTAGGTTCTTC	102 bp
<i>Nr4a3</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>	NM_015743.3	fw: CAAGCCTTAGCCTGCCTGTC rv: AGCCTGTCCCTTCTCTGGT	132 bp
<i>Ppargc1a (Pgc-1a)</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha</i>	NM_008904.2	fw: CGTAGGCCAGGTACGACAG rv: TTTCAGACTCCCGCTTCTCG	94 bp
<i>Rn18s</i>	<i>18S ribosomal RNA</i>	NR_003278.3	fw: AGTGGGGTCATAAGCTTGC rv: TCCGAGGGCCTCACTAAACC	
<i>Rps12</i>	<i>Ribosomal protein S12</i>	NM_011295.6	fw: CTCATCCACGATGGCCTAGC rv: AGTGCCTCCACCAGCTTGAC	128 bp
<i>Tbp</i>	<i>TATA box binding protein</i>	NM_013684.3	fw: AGAGAGCCACGGACAACCTGC rv: GGGAAGCCCAACTTCTGCAC	128 bp
<i>Ucp3</i>	<i>Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)</i>	NM_009464.3	fw: AACCCAGGGGCTCAGAGCGT rv: GTCCGCTCCCTTGGGGGTGT	189 bp
<i>Xpo5</i>	<i>Exportin 5</i>	NM_028198.2	fw: CCGTGCACGAATGAGCTTTT rv: AGGGGTTACGGAAGATGGGA	143 bp
<i>Zfp36</i>	<i>Zinc finger protein 36</i>	NM_011756.4	fw: GCCACCATGGATCTCTCTGC rv: GATTCGGTTCCTCCGTGGTC	108 bp

miRNA-ID	miRBase accession number	Primer-Sequenz (5'-3')	Länge des Primers
<i>mmu-miR-1a-3p</i>	MIMAT0000123	TGGAATGTAAGAAGTATGTATAAAA	26 bp
<i>mmu-miR-107-3p</i>	MIMAT0000647	AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA	23 bp
<i>mmu-miR-133a-3p</i>	MIMAT0000145	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG	22 bp
<i>mmu-miR-133b-3p</i>	MIMAT0000769	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA	22 bp
<i>mmu-miR-208b-3p</i>	MIMAT0004939	ATAAGACGAACAAAAGGTTTGTA	25 bp
<i>mmu-miR-29a-3p</i>	MIMAT0000535	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA	22 bp
<i>mmu-miR-20a-5p</i>	MIMAT0000529	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	23 bp
<i>mmu-miR-20b-5p</i>	MIMAT0003187	CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG	23 bp
<i>mmu-miR-206-3p</i>	MIMAT0000239	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG	22 bp

Die unten notierten Primer wurden von der Firma Qiagen GmbH, Hilden, bezogen:

Gensymbol	Genname	NCBI Reference Sequence
<i>SNORD95</i>	<i>Small Nucleolar RNA, C/D Box 95</i>	LN872921.1
<i>SNORD96A</i>	<i>Small Nucleolar RNA, C/D Box 96A</i>	LN872924.1
<i>RNU6</i>	<i>U6 small nuclear RNA</i>	NR_003027.2

3.1.3. Kommerzielle Kits

miRNeasy Mini Kit
miScript II RT Kit

Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen GmbH, Hilden

miScript SYBR Green PCR Kit for Use with miScript Primer Assays Qiagen GmbH, Hilden

3.1.4. Geräte

<i>BeadBug Microtube Homogenizer</i>	Multimed Biotechnologie Kontor, Kirchheim unter Teck
<i>CFX96 Touch™ Realtime PCR Detection System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Corning® LSE™ Vortex Mixer</i>	Corning Incorporated, USA
<i>DPU-414 Thermal Printer</i>	Seiko Instruments GmbH, Neu-Isenburg
<i>Elektronische Präzisionswaage BP 610</i>	Sartorius GmbH, Göttingen
<i>Eppendorf BioPhotometer</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Fahrradtachometer CM 4.11</i>	Ciclosport, K.W. Hochschorner GmbH, Gräfelfing
<i>Fast-Trac®-Laufteller</i>	Plex B.V., Elst, Niederlande
<i>Heraeus™ Multifuge™ X1R Centrifuge</i>	Thermo Scientific, Karlsruhe
<i>iCycler iQ™ Realtime PCR Detection System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Laboratory refrigerator, MediLine -20 °C</i>	Liebherr, Kirchdorf
<i>Mikro200R-Zentrifuge</i>	Hettich Holding Beteiligungs- und Verwaltungs GmbH, Tuttlingen
<i>Mikrobiologischer Brutschrank</i>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
<i>Mikroskop Wilovert 30</i>	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
<i>Mouse Igloo®</i>	Plex B.V., Elst, Niederlande
<i>Shaking water bath 1083</i>	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
<i>Tiefkühlschrank HERAfreeze HFU400T -50 °C to -86 °C</i>	Thermo Scientific, Karlsruhe

3.2. Methoden

3.2.1. Arbeit mit Versuchstieren

3.2.1.1. Mäusestamm

C57BL/6J Mouse Charles River, Sulzfeld, Germany

3.2.1.2. Laufradtraining

Das *in vivo*-Experiment wurde an insgesamt acht Mäusen des Inzuchtstammes C57BL/6J durchgeführt. Das Alter der Tiere betrug bei Anlieferung sieben Wochen. Es wurden ausschließlich männliche Tiere für den Versuch verwendet, um hormonelle bzw. zyklusbedingte Schwankungen auszuschließen. Zunächst wurden die Tiere in zwei Gruppen mit je vier Mäusen zur Eingewöhnung gehalten, dann aber mit Beginn des Versuchs jeweils einzeln in Standard-Makrolon-Käfigen (Typ III-Käfige) mit geeigneter Einstreu und Zellstoff, sowie mit einem Holzhäuschen zum Schutz, untergebracht. Diese Käfige wurden aus Platzgründen gewählt, um genügend Raum zur Unterbringung des Laufrads zu gewährleisten. Im Drahtgitterdeckel befanden sich eine Futtermulde sowie ein abgeteilter Flaschenhalter. Die Tiere wurden unter Standard Laborbedingungen bei

einer Umgebungstemperatur von 22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55–65 % gehalten. Den Tieren stand eine Standard-Haltungsdiät und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Da es sich bei Mäusen um nachtaktive Tiere handelt, erfolgte von 17–5 Uhr eine automatisierte Dunkelphase.

Nach einer Woche Eingewöhnungszeit wurde mit dem eigentlichen Trainingsexperiment begonnen. Die Tiere wurden zufällig in zwei Gruppen, Läufer und Nicht-Läufer, unterteilt, mit individuellen Nummern gekennzeichnet und entsprechend auf die Käfige aufgeteilt. Die Käfige der Läufer wurden entsprechend mit einem *Mouse Igloo*® und dem dazugehörigen *Fast-Trac*®-Lauffeller ausgestattet. Zur Aufzeichnung der Laufstrecke wurde der Fahrradtachometer CM 4.11 der Marke Ciclosport® genutzt. Dazu wurde der Empfänger des Tachometers mithilfe von *SUGRU*® *Mouldable Glue* im *Mouse Igloo*® befestigt und ein Neodymmagnet mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Dicke von 2 mm an der Unterseite des *Fast-Trac*®-Lauffellers festgeklebt. Die Fahrradtachometer wurden dann mit Kabelbindern am Regal neben dem entsprechenden Käfig befestigt. Die Übertragung vom Empfänger zum Tachometer selber erfolgte kabellos. Dabei wurden lediglich die gelaufenen Kilometer auf dem Laufrad, nicht aber jene außerhalb des Rades, erfasst.

Die Tachometer wurden unter der Woche täglich abgelesen und die gelaufene Strecke in einer Tabelle protokolliert. Es wurde darauf geachtet, dass das Laufrad zu diesem Zeitpunkt freistand und nicht durch Einstreu in seiner Funktion gestört wurde. Zudem wurde wöchentlich eine Gewichtskontrolle durchgeführt und das festgestellte Gewicht für jede Maus notiert. Das Handling aller Tiere erfolgte immer von der selben Person und gegen 11 Uhr am Vormittag.

Nach 5 Wochen wurde die Position der Käfige der Tiere gewechselt. Jene Tiere, deren Käfige zuvor im Regal unten positioniert waren, wechselten nach oben, und *vice versa*.

3.2.1.3. Laufbandtraining

Auch hier betrug das Alter der Tiere betrug bei Anlieferung sieben Wochen. Es wurden ausschließlich männliche Tiere für den Versuch verwendet, um hormonelle bzw. zyklusbedingte Schwankungen auszuschließen. Die Tiere wurden in Standard-Makrolon-Käfigen (Typ II-Käfige) mit geeigneter Einstreu und Zellstoff, sowie mit einem Holzhäuschen zum Schutz, untergebracht. Im Drahtgitterdeckel befanden sich eine Futtermulde sowie ein abgeteilter Flaschenhalter. Die Tiere wurden unter den gleichen Standard Laborbedingungen gehalten.

Vierzehn Tage vor dem Start des Experiments wurden die Tiere drei mal pro Woche in das abgeschaltete Laufband gesetzt, um sich an dieses zu gewöhnen. Die Tiere der Laufband-Gruppe absolvierten drei Trainingseinheiten pro Woche mit einer Dauer von einer Stunde. Das Training fand zwischen 17 und 18 Uhr statt. Bis Trainingswoche 5 wurden sie langsam an die Trainingsbedingungen (24 cm/sec, 15° Steigung) herangeführt, indem die Geschwindigkeit und Steigung schrittweise erhöht wurde. Ab Trainingswoche 5 wurden die Mäuse nur noch mit 24 cm/sec und 15° Steigung belastet.

3.2.1.4. Tötung und Präparation der Versuchstiere

Die Anästhesie der Tiere erfolgte einzeln im jeweils eigenen Käfig durch Zugabe von Isofluran (Isofluran CP®, 1 ml/ml, CP Pharma Handelsgesellschaft mbH, Deutschland). Die Tiere wurden, nachdem sie vollständig bewusstlos waren, durch die Laborleiterin mittels cervicaler Dislokation getötet. Anschließend wurden der *M. gastrocnemius*, der *M. soleus*, der *M. tibialis anterior* und der *M. quadriceps* der Hintergliedmaßen, sowie der *M. pectoralis* und der *M. triceps longus* beider Vordergliedmaßen präpariert. Zudem wurden sowohl das Zwerchfell und das Herz als auch das gonadale Fettgewebe entnommen. Zur Konservierung wurden die Muskeln der linken Hintergliedmaßen in *RNAlater*® verbracht. Die Muskeln der rechten Hintergliedmaße wurden zwischen zwei Stückchen gekochter Kalbsleber mithilfe von Tissue-Tek® auf einem Stück Kork befestigt und in schmelzendem Isopentan, gekühlt in flüssigem Stickstoff, bei -196 °C gefroren. Alle gewonnenen Proben wurden sofort in einem -80 °C-Tiefkühlschrank bis zur Probenaufbereitung aufbewahrt.

Für den Versuch wurde eine Mitteilung nach §4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes mit dem Aktenzeichen 35/9185.82-2 gemacht. Das gesamte Experiment fand unter Einhaltung des geltenden Tierschutzgesetzes statt und wurde vom Veterinärdirektor Dr. med. vet. Franz Iglauer von der Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Eberhard Karls Universität und des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt und vor Ort durch Mitarbeiter des Tierärztlichen Dienstes überprüft.

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe

Aufgrund der ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen (RNAsen) wurden diverse Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz des Probenmaterials ergriffen. Zum einen wurden sämtliche Arbeitsflächen vor Arbeitsbeginn mit *RNase AWAY*® gereinigt. Zusätzlich wurden bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen und nur sterile, autoklavierte Pipettenspitzen und Kunststoffgefäße genutzt.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA, inklusive kleiner RNAs, wurde das käuflich erworbene *miRNeasy Mini Kit*® von Qiagen genutzt. Die Isolierung erfolgte in mehreren Schritten in Anlehnung an das Herstellerprotokoll.

Zunächst wurden 30 mg des zu bearbeitenden Gewebes abgewogen. Wenn nicht mit *RNAlater*®-stabilisiertem Gewebe gearbeitet wurde, musste darauf geachtet werden, dass das Gewebe nicht auftaute, bevor es in das *QIAzol*-Lysereagenz gegeben wurde. Danach wurde das Gewebe in *BeadBug*-Röhrchen mit *Precelly Beads* gegeben und 700 µl *QIAzol*-Lysereagenz zur Homogenisierung dazugegeben. Die Probe wurde für 60 Sekunden im *BeadBug Microtube Homogenizer* homogenisiert, bis sie optisch gleichmäßig homogen war. Dann wurde das Homogenisat bei Raumtemperatur (15-25 °C) für fünf Minuten inkubiert, um die Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu fördern.

Im nächsten Schritt wurden 140 µl Chloroform in das Röhrchen mit dem Homogenisat gegeben, das Röhrchen verschlossen und für 15 Sekunden kräftig geschüttelt, um es dann für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nachfolgend wurde die Probe für 15 Minuten bei 12.000×g bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation trennte sich die Probe in 3 Phasen: eine obere, farblose, wässrige Phase, welche RNA enthielt; eine weiße Interphase und eine untere, rote, organische Phase. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Sammelröhrchen übertragen, 525 µl 100%iger Ethanol zugegeben und der Ansatz durch Pipettieren vermischt. Die Hälfte der Probe wurde auf eine *RNeasy-Mini-Spin-Column* in einem 2 ml-Sammelröhrchen pipettiert und bei 8.000×g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt mit der restlichen Probe wiederholt. Es folgte die Zugabe von 700 µl RWT-Buffer zur *RNeasy-Mini-Spin-Column*. Die Probe wurde wiederum für 15 Sekunden bei 8.000×g zentrifugiert, um die Säule zu waschen, und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 500 µl RPE-Buffer auf die *RNeasy-Mini-Spin-Column* gegeben,

bei 8000xg für 15 Sekunden zentrifugiert, und der Durchfluss wiederum verworfen. Anschließend wurden wiederum 500 µl RPE-Buffer zur *RNeasy-Mini-Spin-Column* hinzugefügt und für 2 Minuten bei 8000xg zentrifugiert, um die RNeasy-Mini-Spin-Säulenmembran zu trocknen. Nach dem Zentrifugieren wurde die RNeasy-Mini-Spin-Column aus dem Röhrchen vorsichtig entfernt, so dass die Säule den Durchfluss nicht berührte, in ein neues 2 ml Sammelröhrchen gegeben und bei voller Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert. Als nächstes wurde die *RNeasy-Mini-Spin-Column* in ein neues 1,5 ml-Sammelröhrchen übertragen und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die *RNeasy-Mini-Spin*-Säulenmembran pipettiert. Die Probe wurde für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Um eine höhere Gesamt-RNA-Konzentration zu erhalten, wurde ein zweiter Elutionsschritt unter Verwendung des ersten Eluats durchgeführt.

3.2.2.2. Messung der RNA-Konzentration

Die Messung der RNA-Konzentration in den Eluaten erfolgte durch Photometrie bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm. Die Messung der Absorption erfolgte in Kunststoffküvetten. Als Referenz wurde nukleasefreies Wasser genutzt. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde durch das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm zu denen bei 280 nm und 230 nm überprüft. Dabei wurden nur solche Proben für weitere Analysen verwendet, bei denen der Quotient 260/280 zwischen 1,8 und 2,0 und der von 260/230 $\geq 2,0$ lag.

3.2.2.3. Synthese von cDNA

Zur Synthese der sogenannten *complementary DNA* (cDNA) wird sich des Prinzips der reversen Transkription bedient. Hierbei synthetisiert eine RNA-abhängige DNA-Polymerase DNA-Kopien eines RNA-Stranges, die cDNA. Für diese Arbeit wurde das Qiagen *miScript II RT Kit* genutzt. Dieses Kit bietet die Möglichkeit, sowohl die gesamte RNA inklusive kleiner RNAs, als auch nur die kleinen RNAs umzuschreiben. Hierfür bedient man sich zweier verschiedener Puffer, dem *HiFlex*- oder dem *HiSpec*-Puffer.

Die isolierte RNA musste, sofern sie vor der cDNA Synthese eingefroren wurde, zunächst auf Eis aufgetaut werden. Es wurden dann 0,5 µg der isolierten RNA mit nukleasefreiem Wasser versetzt, um ein Gesamtvolumen von 12 µl zu erreichen. Im nächsten Schritt wurde der „Reverse-Transcriptase-Master-Mix“ hergestellt. Dieser bestand aus folgenden Bestandteilen:

4 µl 5x miScript HiSpec Puffer oder 5x miScript HiFlex Puffer

2 µl 10x *miScript Nucleics Mix*

2 µl 10x *miScript Reverse Transcriptase Mix*

Die eigentliche Synthese erfolgte dann mittels zweier unterschiedlich temperierter Inkubationsschritte:

60 Minuten bei 37 °C

5 Minuten bei 95 °C (Inaktivierung)

Die so erhaltene cDNA wurde vor der weiteren Verwendung in der *Realtime-PCR* mit nukleasefreiem Wasser entsprechend verdünnt und bei -20 °C zwischengelagert.

3.2.2.4. Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Grundsätzlich funktioniert die quantitative *Realtime-PCR* durch die Detektion eines während der Amplifikation eines PCR-Produktes entstehenden Fluoreszenzsignals, das proportional verläuft (Livak und Schmittgen, 2001). Während bei der konventionellen PCR lediglich eine Endpunkt-Detektion stattfindet, wird bei der quantitativen *Realtime-PCR* am Ende eines jeden Zyklus die durch einen Fluoreszenz Farbstoff emittierte Fluoreszenz detektiert. Dieses Fluoreszenz-Signal bildet die *Template*-Vermehrung während der exponentiellen Phase der PCR ab (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). So kann zum einen die *Template*-Menge in einer Reaktion quantifiziert werden (= absolute Quantifizierung) und zum anderen können Unterschiede zwischen verschiedenen Proben gemessen werden (= relative Quantifizierung).

Detektion von mRNA

Zur relativen Quantifizierung von mRNA wurde zur Detektion des Fluoreszenzsignals der in dsDNA interkalierende, fluoreszierende Farbstoff *SsoFast™ EvaGreen®* eingesetzt.

Pro Vertiefung einer 96-Well-Plate wurde folgender Reaktionsansatz eingesetzt:

0,6 µl 1:5 verdünnte cDNA

4,4 µl RNase-freies Wasser

2,5 µl *Primer-Mix* (*Forward* und *Reverse Primer* plus nukleasefreies Wasser = 1,8 µM)

7,5 µl *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (2 x)

Dabei wurde folgendes Zeit-Temperatur-Protokoll angewandt:

95 °C für 30 Sekunden (Enzymaktivierung)

40 Zyklen à

95 °C für 5 Sekunden (Denaturierung)

59 °C für 15 Sekunden (*Annealing/ Elongation*)

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats zur Spezifitätsüberprüfung der PCR-Produkte im Bereich von 65–95 °C.

Detektion von miRNA

Zur relativen Quantifizierung von miRNA wurde zur Detektion des Fluoreszenzsignals das von der Firma Qiagen hergestellte *miScript SYBR Green PCR Kit* genutzt. Bei dem hier verwendeten fluoreszierenden Farbstoff handelt es sich um *SYBR Green 1*.

Pro Vertiefung einer 96-Well-Platte wurde folgender Reaktionsansatz eingesetzt:

0,6 µl 1:25 verdünnte cDNA

3,9 µl RNase-freies Wasser

1,5 µl 10x *miScript Universal Primer*

1,5 µl miRNA *Primer* (mit einer Konzentration von 1,8 µM)

7,5 µl 2x *QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix*

Dabei wurde folgendes Zeit-Temperatur-Protokoll angewandt:

95 °C für 15 Minuten (Enzymaktivierung)

40 Zyklen à

94 °C für 15 Sekunden (Denaturierung)

55 °C für 30 Sekunden (*Annealing*)

70 °C für 30 Sekunden (*Elongation*)

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats zur Spezifitätsüberprüfung der PCR-Produkte im Bereich von 55–95 °C.

3.2.3. Analyse der qPCR Daten

Jener Zyklus, bei dem erstmalig die Mindestmenge an Amplifikat vorhanden ist, die notwendig ist, um ein nachweisbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen, wird als *threshold cycle* (Ct) bezeichnet. Der Vergleich der einzelnen Proben konnte über Berechnungen mit ebendiesem Ct-Wert stattfinden. Allgemein gesprochen gilt: Je kleiner der Ct-Wert, desto größer ist die Menge an Ziel-cDNA.

Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur Normalisierung (Livak & Schmittgen, 2001) angewandt. Hierbei werden neben den interessierenden *Targets* auch Referenzgene, sogenannte *Housekeeping*-Gene, amplifiziert. Voraussetzung für *Housekeeping*-Gene ist, dass sie ubiquitär und weitgehend konstant, das heißt ohne nennenswerten Einfluss durch Umweltfaktoren, exprimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst fünf *Housekeeping*-Gene

analysiert: *TBP* (*TATA-box binding protein*), *RPS12* (*Ribosomal Protein S12*), *GAPDH* (*Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*), *18S* (*18S ribosomal RNA*) und *HPRT* (*hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase*). Mittels des Online-Tools RefFinder (Xie et al., 2012) konnten drei Referenz-Gene ausgewählt werden, die die geringste Varianz aufwiesen. Für die vorliegende Arbeit waren dies *TBP*, *RPS12* und *HPRT*.

Für die Auswertung der miRNA-Daten wurden *SNORD95*, *SNORD96a* und *RNU6* als *Housekeeping*-Gene ausgewählt.

Zur Analyse wurden die Ct-Werte gegen das geometrische Mittel der drei Referenz-Gene normalisiert. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta Ct = Ct_{probe} - Ct_{Housekeeping}$$

Anschließend erfolgte die Ermittlung des $\Delta\Delta Ct$ - Wertes für jede Probe anhand der folgenden Formel:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Behandelt} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

Zur Auswertung der gesammelten Daten wurde das iCycler iQ™ *Realtime PCR* Detection System von Bio-Rad Laboratories GmbH genutzt. Zur statistischen Auswertung wurde zum einen das Analyseprogramm REST (REST = Relative Expression Software Tool (Pfaffl et al., 2002) genutzt, zum anderen das Programm JMP des SAS Institute. Für alle Ergebnisse wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. *In vivo*-Versuche am Mausmodell

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, zu analysieren, inwieweit eine akute Laufbelastung und zwei unterschiedliche zehnwöchige Lauftrainingsprogramme die Konzentrationen verschiedener mRNAs und miRNAs im Skelettmuskel beeinflusst. Für die Analyse wurden Muskeln ausgewählt, die in ihrer Funktion antagonistisch bei der Beugung bzw. Streckung des Sprunggelenkes wirken: der *M. tibialis anterior* und der *M. gastrocnemius*. Zu den Trainingsanpassungen dieser Muskeln gibt es zudem ausreichend Literaturdaten. Die im Rahmen des Experiments gewonnenen Proben aus anderen Muskeln und Geweben sollen im Rahmen zukünftiger Projekte der Arbeitsgruppe Munz verwendet werden.

Wie bereits unter 3.2.1.2. beschrieben wurden die Tiere in Gruppen eingeteilt und über einen Zeitraum von zehn Wochen entweder mit einem Laufrad ausgestattet oder nicht. Des Weiteren konnte auf Skelettmuskelproben vorangegangener Versuche zurückgegriffen werden, bei denen die Tiere entweder einer einmaligen akuten Laufbelastung oder einem Laufbandtraining über zehn Wochen unterzogen worden waren. Auch bei diesen Versuchen standen Proben aus einer parallel geführten Kontrollgruppe ohne Laufbelastung bzw. Training zur Verfügung.

Es wurde auf RNA-Ebene die Expression verschiedener Gene analysiert, welche für Skelettmuskel-Strukturproteine, mitochondriale und metabolische Marker sowie verschiedene entzündungsassoziierte Proteine kodieren. Von diesen Genen war bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt gewesen, dass ihre Expression in Zusammenhang mit körperlichem Training reguliert wird. Zudem wurden die Konzentrationen verschiedener miRNA-Spezies untersucht, für die es in der Literatur Hinweise darauf gibt, dass sie bei Adaptationsreaktionen des Skelettmuskels eine Rolle spielen könnten.

4.2. Anpassungen des Skelettmuskels an eine einmalige Laufbelastung

In vorhergehenden Versuchen der Arbeitsgruppe Munz waren Proben aus einer einmaligen, einstündigen Akutbelastung auf dem Laufband im moderaten Ausdauerbereich an männlichen C57BL/6J-Mäusen im Alter von acht bis neun Wochen gewonnen worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dabei auf Proben des *M. tibialis anterior* und des *M. gastrocnemius*, sowohl von Läufern (Ex) als auch von Nicht-Läufern (Sed), zurückgegriffen werden. Die Muskeln wurden unmittelbar nach der

Belastung entnommen und sofort in *RNAlater*[®] (*M. tibialis anterior*) oder Stickstoff (*M. gastrocnemius*) verbraucht.

Die Darstellung innerhalb der Diagramme dieses Kapitels erfolgt als \log_2 *fold change*. Das bedeutet, dass Werte unter null anzeigen, dass das entsprechende Gen reprimiert wird. Werte über Null zeigen an, dass das entsprechende Gen induziert wird.

Ein Wert von 1 entspricht der doppelten Menge an RNA und somit einem Induktionsfaktor von zwei. Ein Wert von -1 entspricht der halben Menge an RNA und daher einem Repressionsfaktor von 2.

4.2.1. Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene

Bei den Untersuchungen der Tiere, die einer einmaligen, akuten Belastung ausgesetzt waren, wurden vor allem solche Gene auf RNA-Ebene untersucht, von denen aufgrund Arbeiten anderer Autoren bekannt war, dass sie nach einer akuten Belastung in der Skelettmuskulatur vermehrt oder vermindert exprimiert werden (Beiter et al., 2015; Lenk et al., 2010; Nedachi et al., 2008).

Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression von Genen, die mit Inflammation, Anti-Inflammation und zellulärem Stress assoziiert sind

Il-6

Il-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Konzentration unter anderem in Reaktion auf körperliche Arbeit in der Zirkulation zunimmt (Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Il-6*-Gens auf RNA-Ebene bei den Läufern, die ein einmaliges, akutes Training absolviert hatten, keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Nicht-Läufern aufwies. Dies konnte sowohl für den *M. tibialis anterior* als auch den *M. gastrocnemius* nachgewiesen werden und ist in *Abbildung 4-1* dargestellt.

Il-6-r

In Reaktion auf eine akute Belastung steigt der *Il-6-r*-mRNA-Spiegel an. Auch nach einem zehnwöchigen Training bei menschlichen Probanden liegen im Skelettmuskel höhere *Il-6-r*-mRNA-Spiegel im Vergleich zu vor dem Training vor (Keller et al., 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten Tiere, die eine einmalige, akute Laufbelastung absolviert hatten, weder im *M. tibialis anterior* noch im *M. gastrocnemius*

signifikant erhöhte *Il-6*-r-mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrolltieren. (Abbildung 4-1).

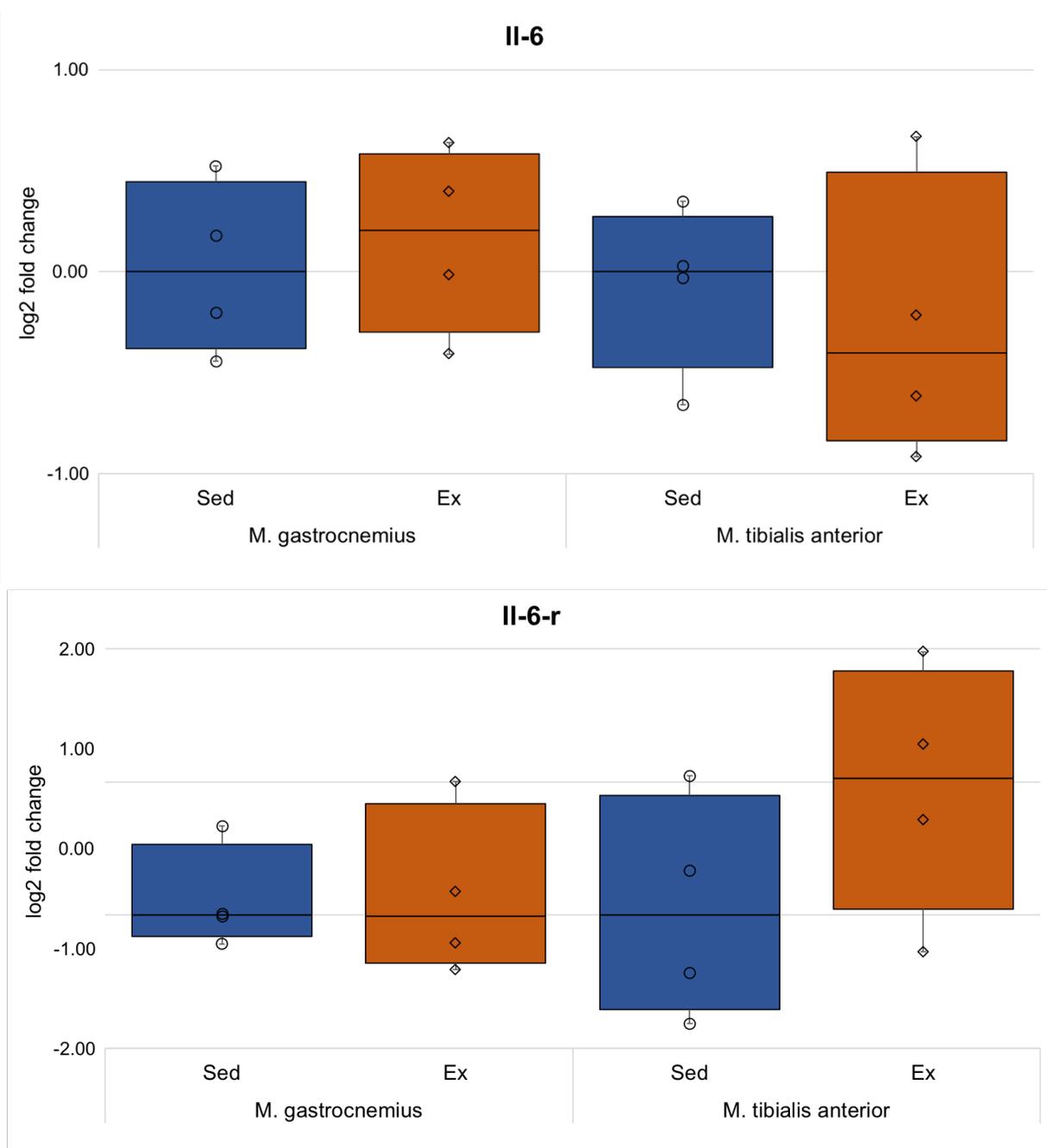


Abbildung 4-1: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene *Il-6* und *Il-6-r* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Cxcl5

Erhöhte *Cxcl5*-Spiegel im Muskel können bereits in Reaktion auf eine dreißigminütige körperliche Belastung von Mäusen gemessen werden (Jergenson et al., 2015).

Wie in *Abbildung 4-2* dargestellt, zeigten die in diesem Versuch untersuchten Muskeln, *M. gastrocnemius* und *M. tibialis anterior*, im Vergleich zwischen den trainierten und den untrainierten Mäusen in der Gruppe der unbehandelten Tiere keine signifikanten Veränderungen der *Cxcl5*-mRNA-Konzentrationen im Muskelgewebe.

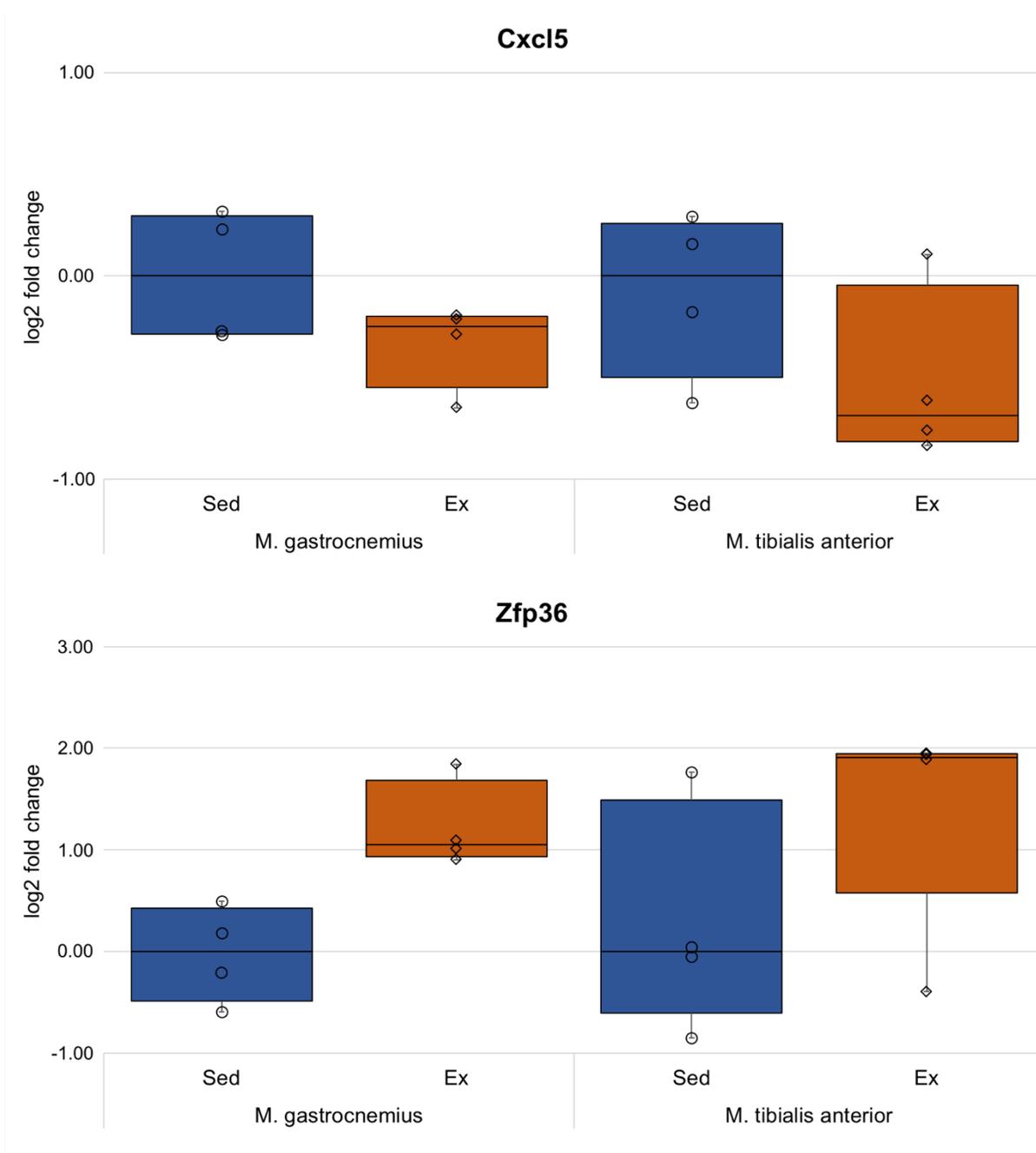


Abbildung 4-2: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene *Cxcl5* und *Zfp36* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Zfp36

Zfp36 spielt bei der Steuerung der myogenen Entzündungsantwort eine entscheidende Rolle, da es in der Lage ist, den Abbau von Transkripten einzuleiten, die für Entzündungsmediatoren kodieren (Bakheet et al., 2001; Beiter et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Analyse des *M. gastrocnemius* keine signifikant unterschiedliche Konzentration von Zfp36-mRNA festgestellt werden, auch wenn es eine Tendenz zu einer Induktion nach Laufbelastung gab. Auch im *M. tibialis anterior* konnte keine Signifikanz beobachtet werden (Abbildung 4-2).

Ho1

Die *Ho1*-Expression im Skelettmuskel wird durch körperliche Aktivität induziert (Vesely et al., 1998). Zudem konnte bei Sportlern eine Repression der *Ho1*-Basisexpression beobachtet werden, was als ein Anpassungsmechanismus an regelmäßiges körperliches Training gesehen wird (Niess et al., 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei einer einmaligen, akuten Laufbelastung ein Trend hinsichtlich einer erhöhten *Ho1*-mRNA-Konzentration im *M. gastrocnemius* und im *M. tibialis anterior* beobachtet werden (Abbildung 4-3).

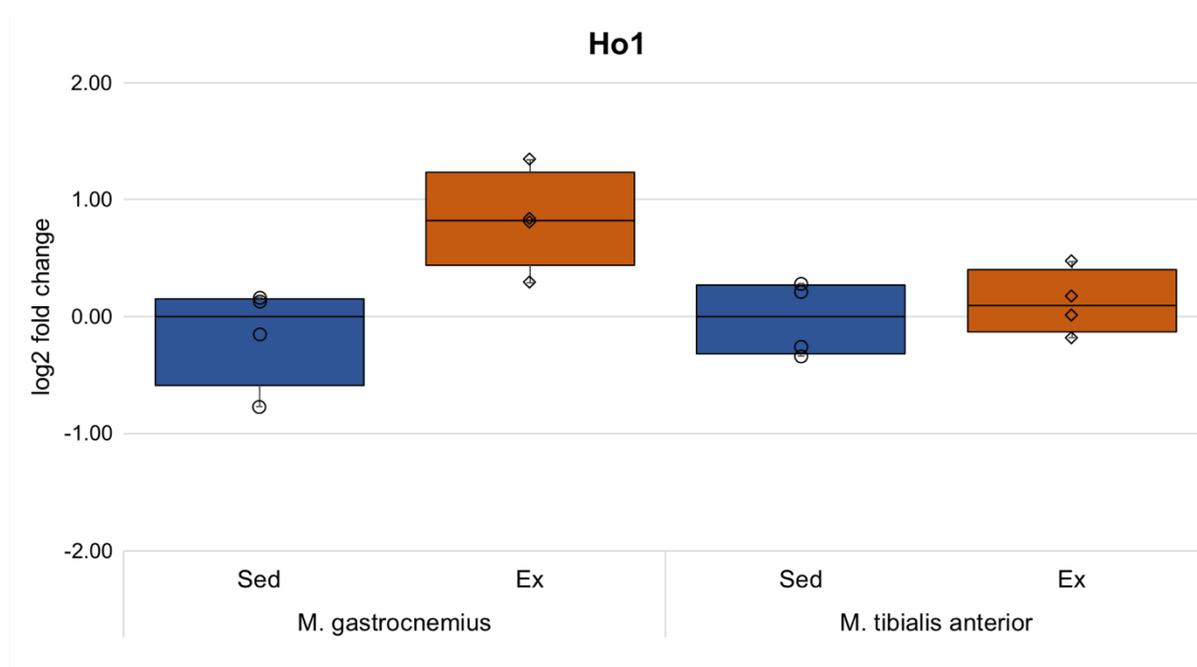


Abbildung 4-3: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens *Ho1* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

MafF

Unter Training konnte im Skelettmuskel eine erhöhte Expression des *MafF*-Gens festgestellt werden (Popov et al., 2017). Es spielt eine wichtige Rolle in der Reaktion auf Stress (Neubauer et al., 2014).

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen konnte im *M. gastrocnemius* auf RNA-Ebene ein Trend zu einer höheren Expression des *MafF*-Gens in der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nicht-Läufer festgestellt werden; dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (*Abbildung 4-4*). Die Konzentrationen im *M. tibialis anterior* wurden aufgrund organisatorischer Ursachen hier nicht gemessen.

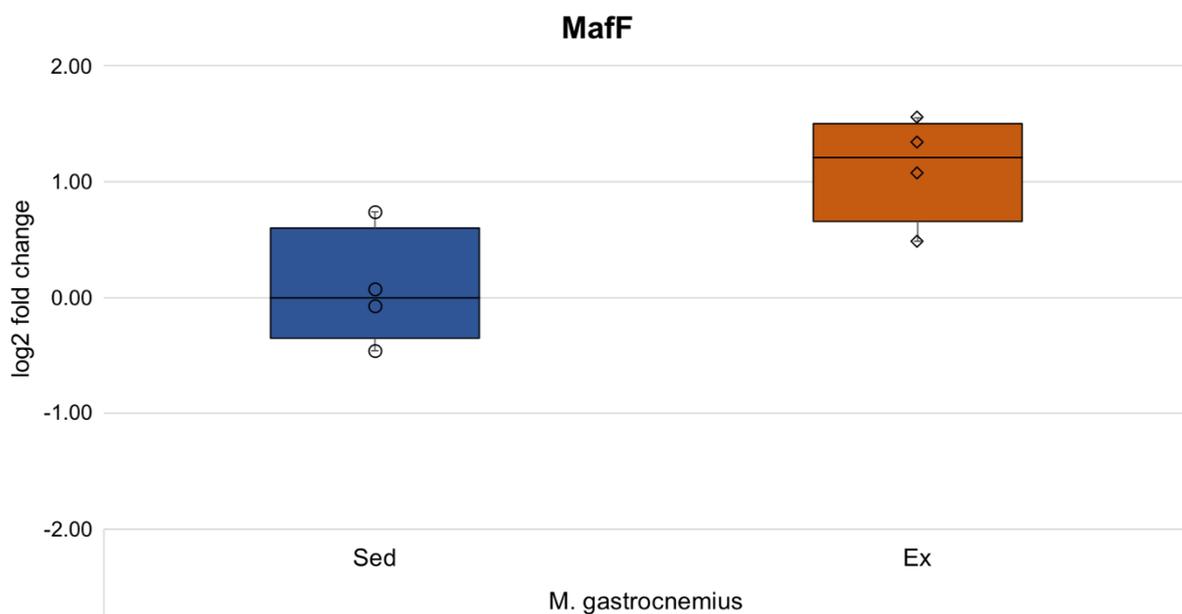


Abbildung 4-4: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens *MafF* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression von Genen, die für die Regulation des Skelettmuskelmetabolismus kodieren

Nr4a3

Nr4a3 reguliert die Skelettmuskelfysiologie und -stoffwechselfunktion (Goode et al., 2016; Pearen & Muscat, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass ein Training die *Nr4a3*-mRNA-Konzentrationen im Muskel erhöht (Kawasaki et al., 2011; Kupr et al., 2017; Pattamaprapanont et al., 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei den Mäusen, die eine Laufbelastung absolviert hatten, für den *M. gastrocnemius* signifikant erhöhte *Nr4a3*-mRNA-Konzentrationen festgestellt werden. Dieser Trend zeigte sich auch im *M. tibialis anterior*, die entsprechenden Unterschiede waren dort jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 4-5).

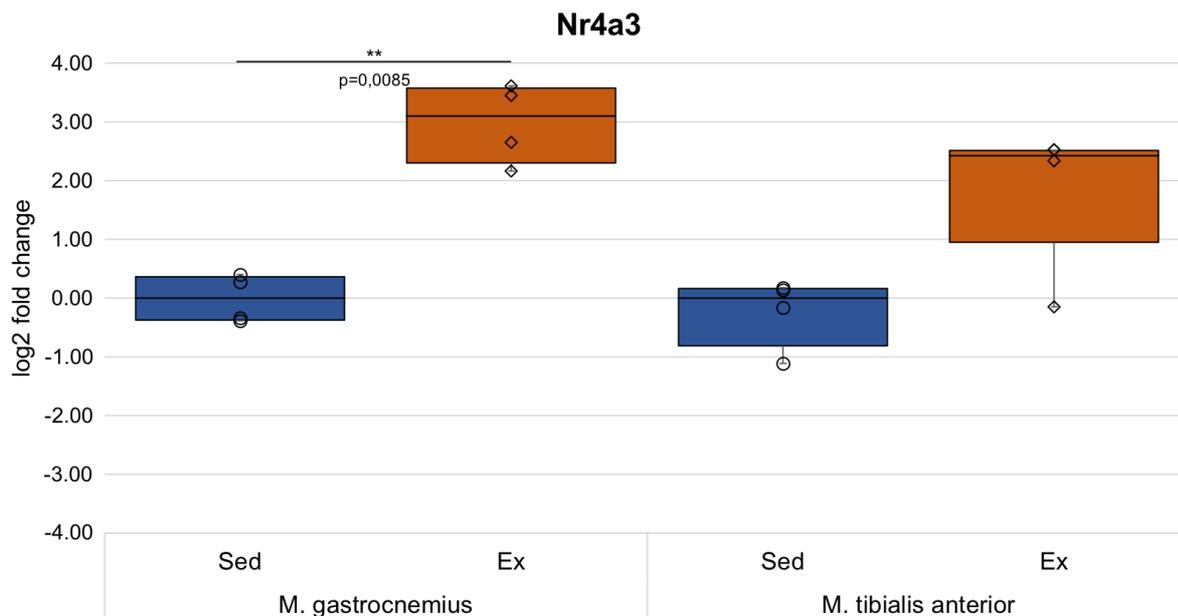


Abbildung 4-5: Analyse der Expression des mit dem Skelettmuskelmetabolismus assoziierten Gens *Nr4a3* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression von Genen, die für metabolische und mitochondriale Marker kodieren

Ucp3

Ucp3 wird hauptsächlich in Mitochondrien der Skelettmuskulatur und dort vor allem unter Training vermehrt exprimiert (Zhou et al., 2000). Es schützt den Muskel bei Anstrengung durch die Anpassung des metabolischen Stoffwechsels (Nabben & Hoeks, 2008).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren konnten auf RNA-Ebene lediglich Trends in Bezug auf das Expressionsniveau des *Ucp3*-Gens festgestellt werden (Abbildung 4-6).

Cox4

Cox4 trägt zur Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran bei (Abu-Libdeh et al., 2017; Vogt et al., 2018) und das

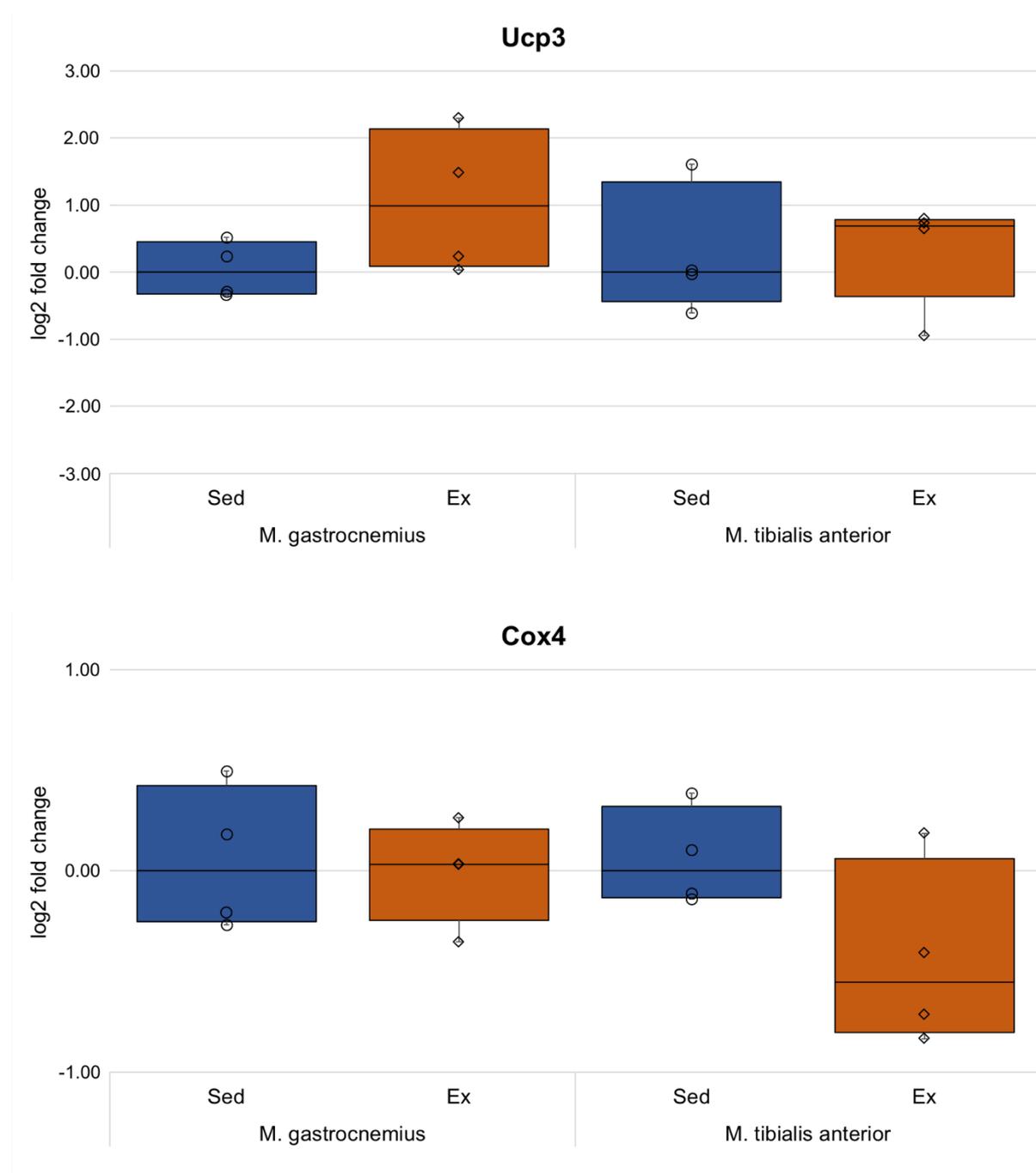


Abbildung 4-6: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene *Ucp3* und *Cox4* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

entsprechende Gen wird unter Training vermehrt in der Skelettmuskulatur exprimiert (Sylviana et al., 2019).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen auf RNA-Ebene zeigte das Expressionsmuster von *Cox4* keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 4-6).

Pgc-1 α

Pgc-1 α ist an der Regulation von Anpassungsreaktionen im Skelettmuskel beteiligt, insbesondere auch im Zusammenhang mit Ausdauertraining (Puigserver & Spiegelman, 2003; Scarpulla, 2008; Wende et al., 2007). Besonders hinsichtlich einer Fasertyp-Transformation und anderen Veränderungen der Skelettmuskulatur rückte es in den Fokus verschiedener muskelbiologischer Arbeitsgruppen (Chinsomboon et al., 2009; Goodpaster et al., 2003; Schiaffino et al., 2007).

Es konnte, zumindest für den *M. gastrocnemius*, ein Trend hin zu einer erhöhten Expression des *Pgc-1 α* Gens in der Gruppe der Läufer beobachtet werden (Abbildung 4-7). Bei den übrigen Gruppen konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden.

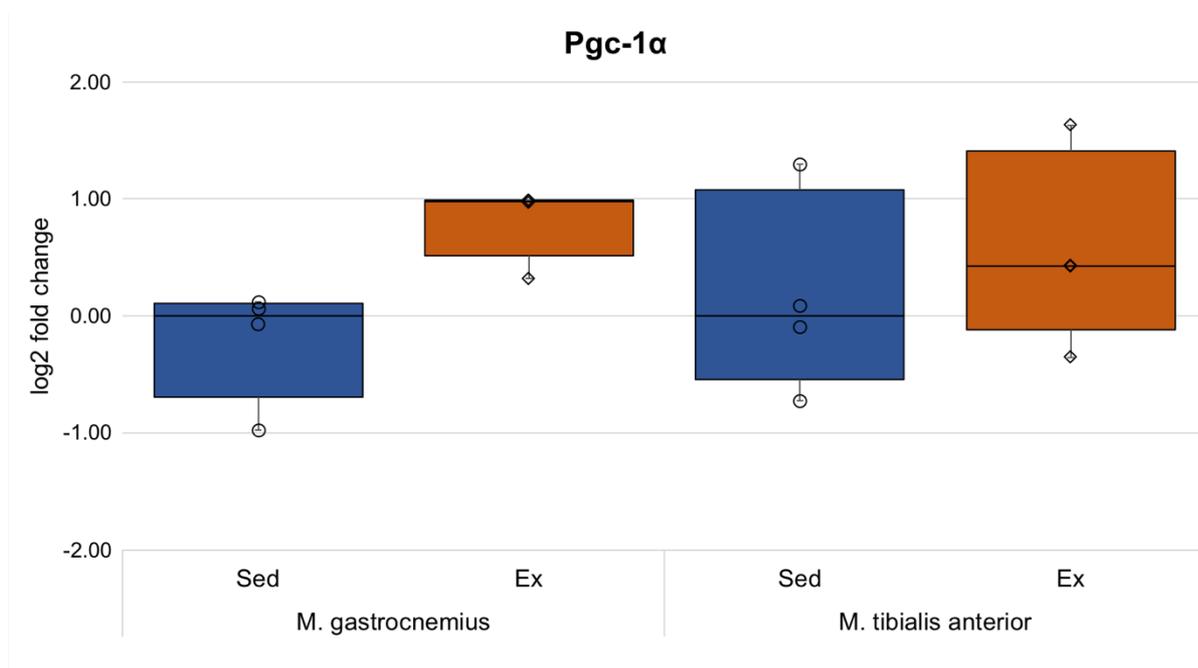


Abbildung 4-7: Analyse der Expression des mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gens *Pgc-1 α* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren

Bei Myosinschwerketten (MyHC) handelt es sich um Motorproteine, welche ATP verwenden, um chemische Energie in mechanische Kräfte umzuwandeln (Weiss et al., 1999). Die Isoformen der Myosinschwerketten charakterisieren den Muskel und bestimmen wesentlich die kontraktilen Eigenschaften einer Muskelfaser (Steinacker, 2002). Alpha-Actinin 3, welches durch das *Actn3*-Gen kodiert wird, sorgt für eine stabile Verbindung von Aktin mit anderen Proteinen und ist somit in die Kontraktion der Skelettmuskulatur involviert. Ein Mangel an Actn3 wirkt sich bei kurzzeitigen Belastungen nachteilig auf die Muskelfunktion aus (North et al., 1999; Pickering & Kiely, 2017).

Myh1, Myh2, Myh7 und Actn3

Wie in *Abbildung 4-8* und *4-9* gezeigt, konnten für keines der untersuchten Gene, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren, signifikante Veränderungen der Expressionsmuster nach Belastung beobachtet werden.

Auch für den Marker *Actn3* war in diesen Muskeln kein Effekt des Trainings zu beobachten (*Abbildung 4-9*).

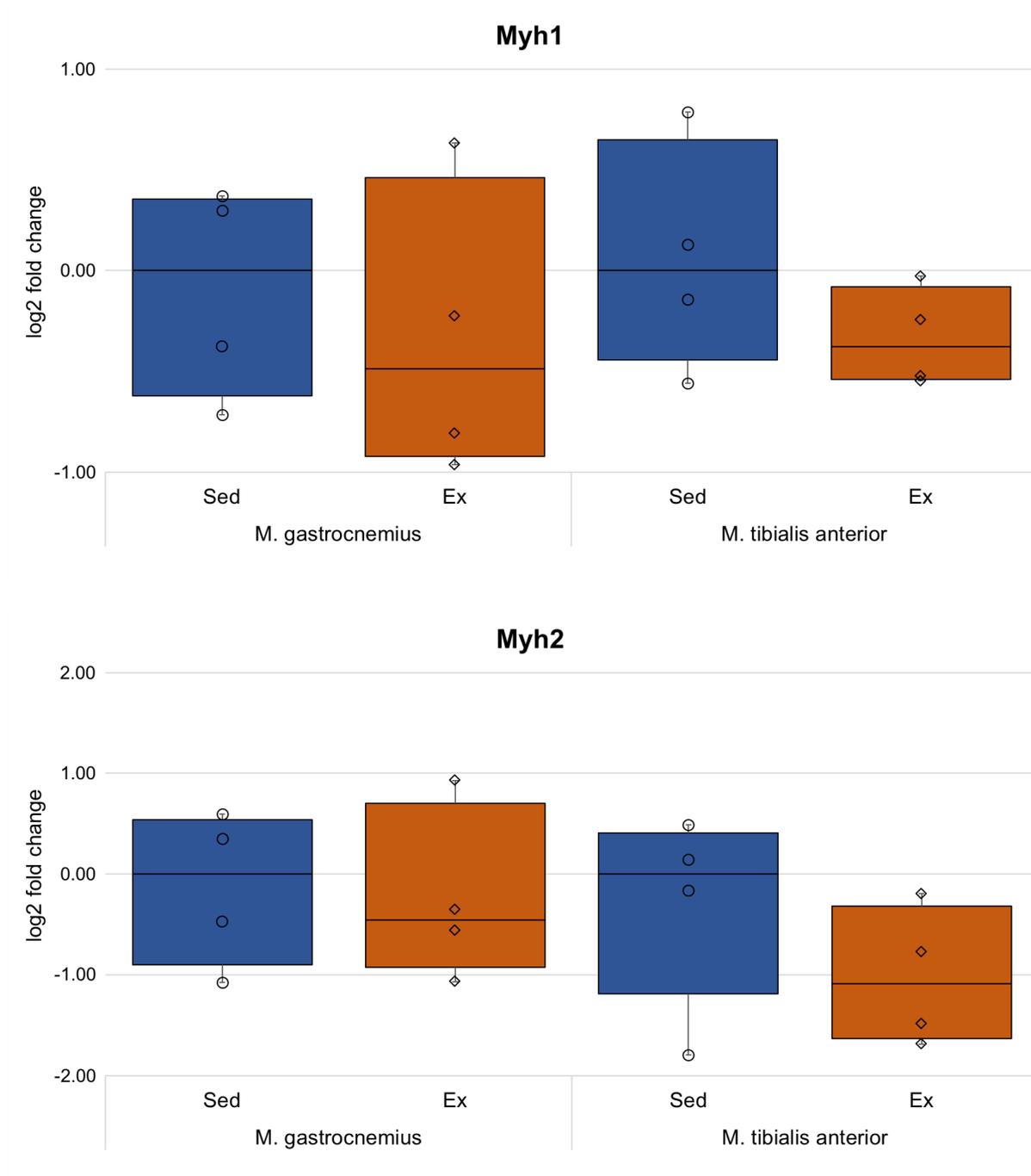


Abbildung 4-8: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene *Myh1* und *Myh2* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

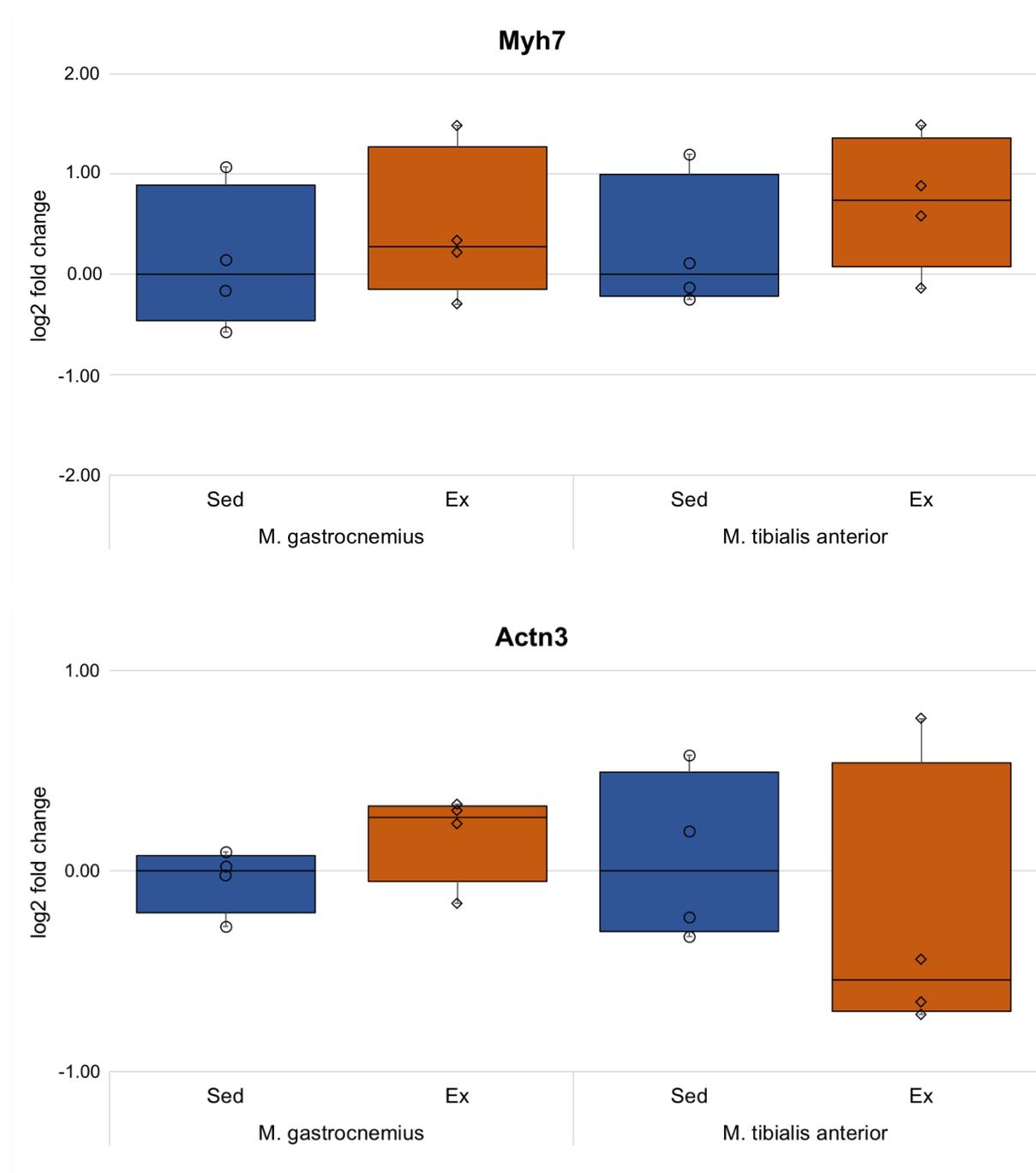


Abbildung 4-9: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene *Myh7* und *Actn3* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression von Genen, die mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziiert sind

Mstn

Mstn reguliert über einen negativen *Feedback*-Mechanismus die Skelettmuskelmasse, das heißt, dass eine Herabregulierung der Genaktivität zu einem vermehrten Muskelwachstum führt (S.-J. Lee, 2004; McPherron et al., 1997; Patel & Amthor, 2005; Savage & McPherron, 2010).

Es konnten keine Veränderungen hinsichtlich der Gen-Exprimierung gefunden werden (*Abbildung 4-10*).

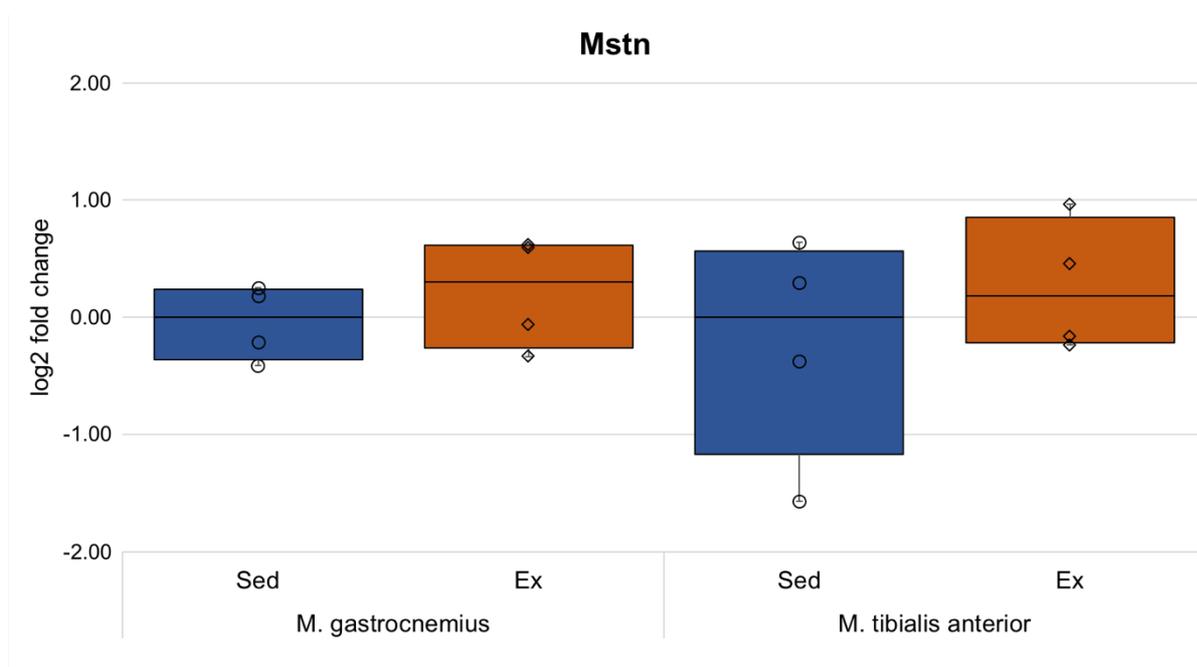


Abbildung 4-10: Analyse der Expression des mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gens *Mstn* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

Murf1

Während Phasen von Muskelatrophie konnten schnell ansteigende *Murf1*-mRNA-Spiegel gemessen werden. Allerdings scheint die primäre Rolle von *Murf1* nicht darin zu bestehen, Muskelatrophie zu verstärken. Vielmehr ist anzunehmen, dass das Protein Muskelumbauprozesse und die metabolische Aktivität des Muskels steuert (Foletta et al., 2011).

In der vorliegenden Studie konnten erhöhte *Murf1*-mRNA-Konzentrationen bei den Läufern sowohl im *M. gastrocnemius* als auch im *M. tibialis anterior* festgestellt werden.

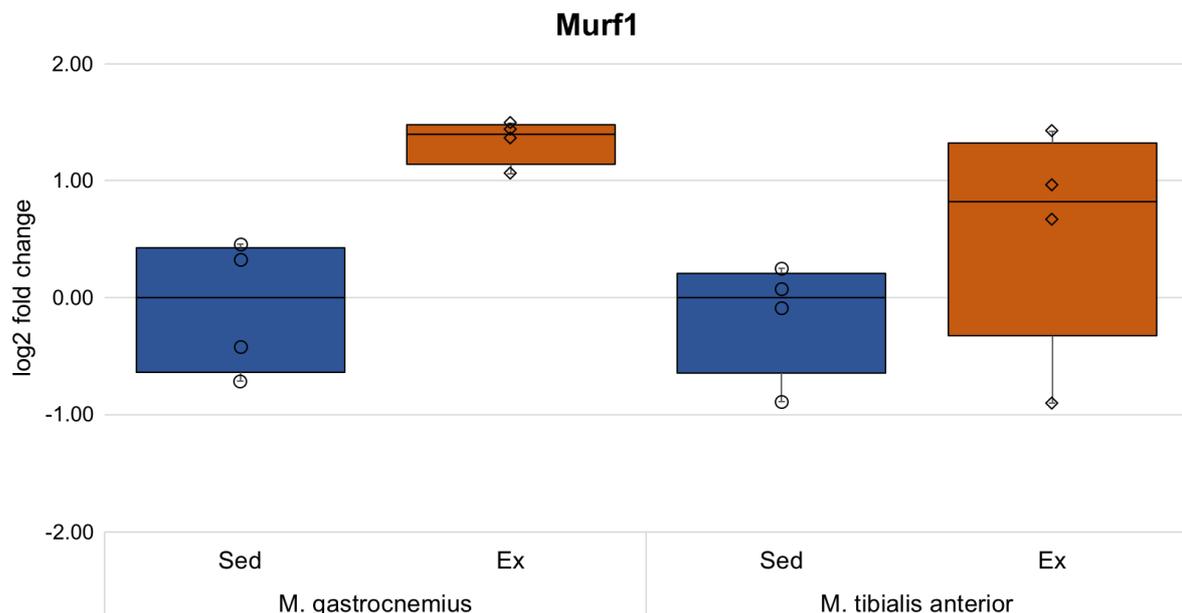


Abbildung 4-11: Analyse der Expression des mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gens *Murf1* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

Diese waren jedoch nicht statistisch signifikant (*Abbildung 4-11*).

Einfluss einer Laufbelastung auf die Expression von Genen, die für Faktoren kodieren, die an der miRNA-Biogenese beteiligt sind

Drosha

Drosha fungiert im Rahmen der miRNA-Biogenese gemeinsam mit *Dgcr8* in einem als Mikroprozessor bekannten Komplex (Denli et al., 2004).

Dgcr8

Dgcr8 ist, als Teil des Mikroprozessor Komplexes, ein essentieller Kofaktor für *Drosha* (Han et al., 2004; Yeom et al., 2006). Durch eine verminderte *Dgcr8*-Expression kommt es zu einer Anhäufung von pri-miRNAs im Nucleus und in Folge zu einer Reduktion reifer miRNAs (Denli et al., 2004).

Dicer1

Bei *Dicer1* handelt es sich um eine cytoplasmatische Ribonuklease (Papachristou et al., 2011), welche einen wichtigen Regulator der miRNA-Biogenese darstellt (S. Kim et al., 2017).

Xpo5

Xpo5 transportiert die pre-miRNA über einen GTP-abhängigen Mechanismus in das Zytoplasma der Zelle (Kim et al., 2009; Siomi & Siomi, 2010). Neben dem Transport scheint *Xpo5* aufgrund seiner Struktur zudem pre-miRNA-Moleküle vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen (Okada et al., 2009).

Weder im *M. gastrocnemius* noch im *M. tibialis anterior* konnten nach Laufbelastung signifikante Veränderungen der Expression von Genen, die für den miRNA-Reaktionsweg kodieren, nachgewiesen werden (Abbildung 4-12 und 4-13).

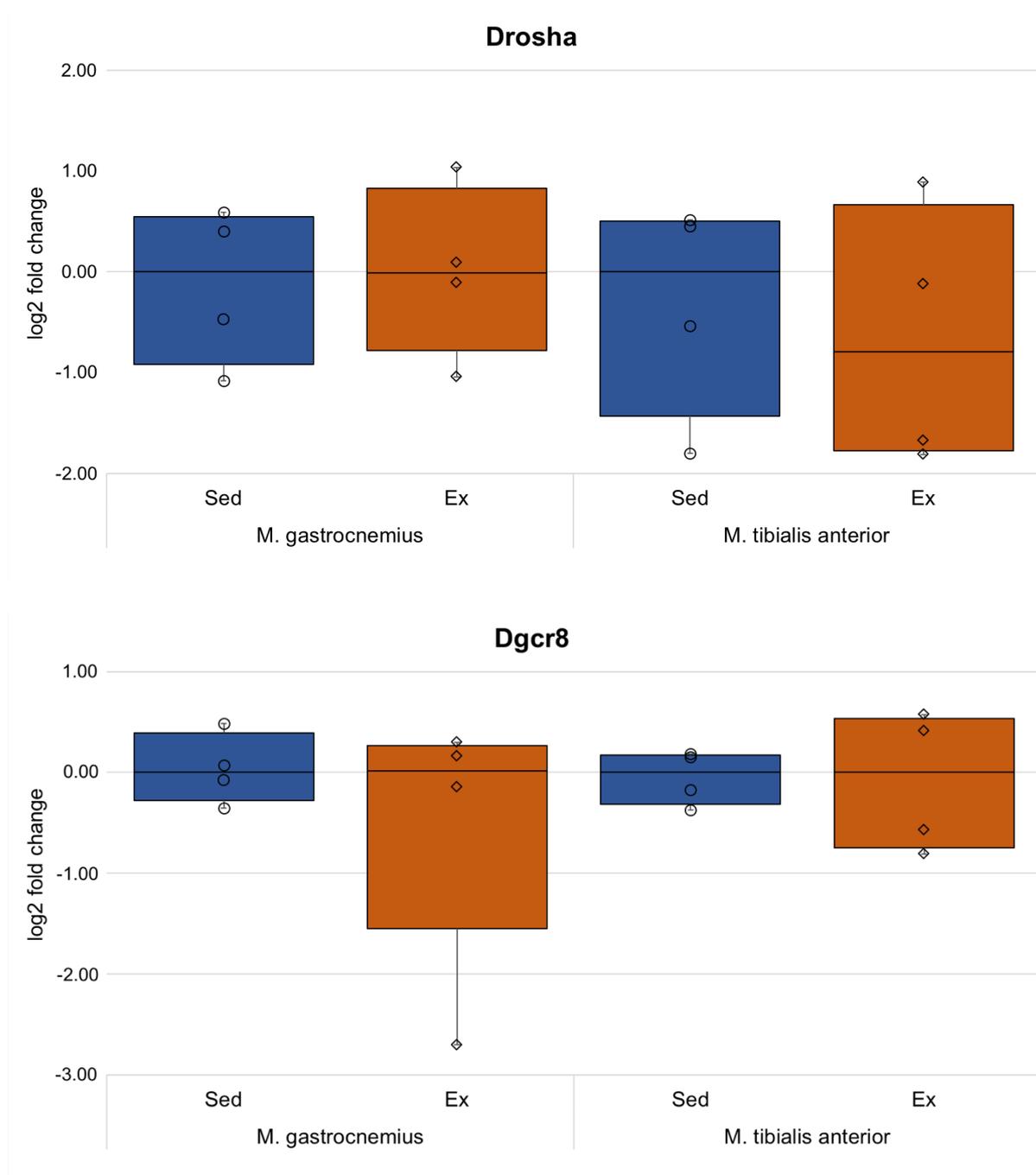


Abbildung 4-12: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Drosha* und *Dgcr8* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als \log_2 fold change dargestellt

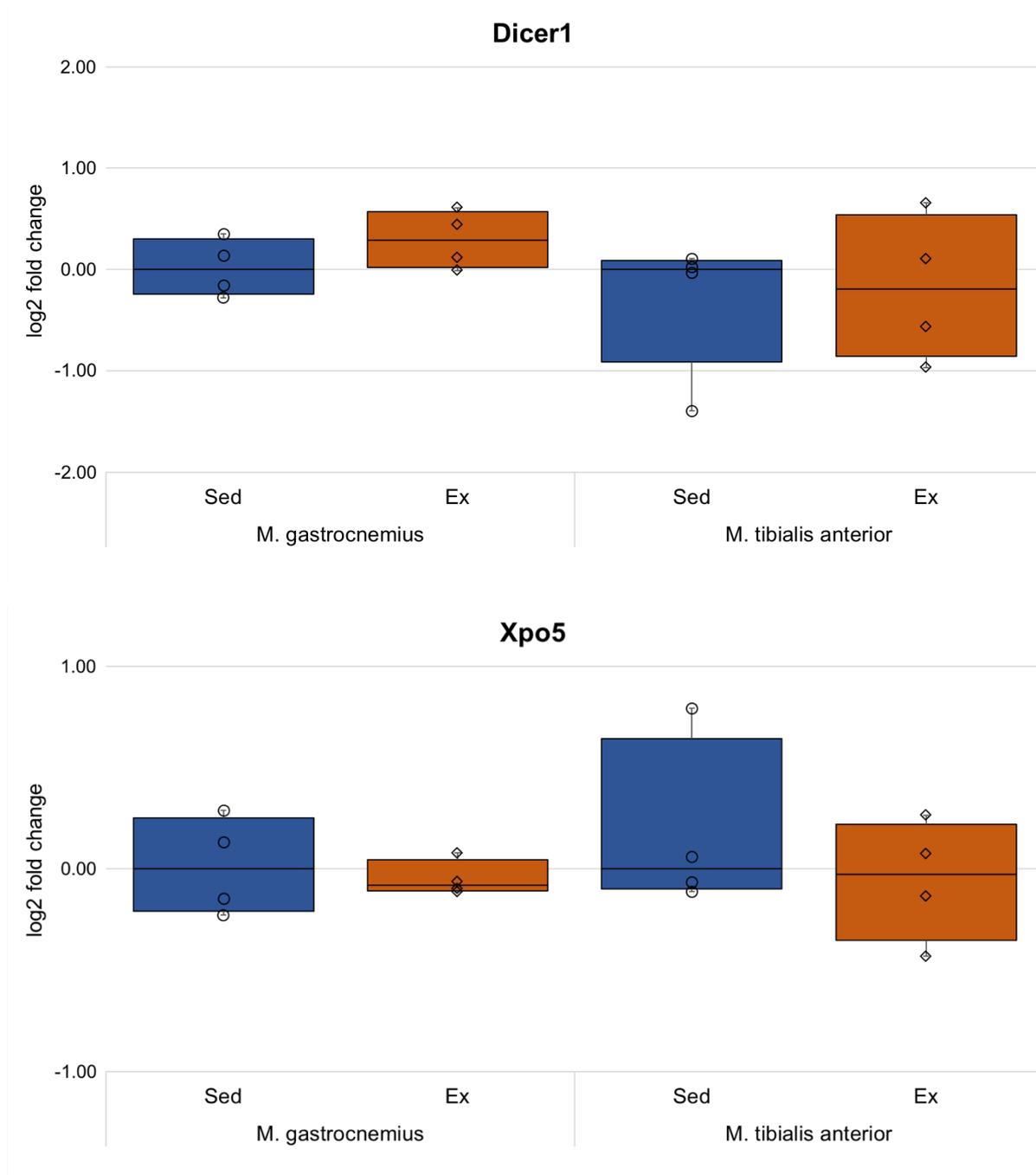


Abbildung 4-13: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Dicer11* und *Xpo5* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

4.2.2. Einfluss einer Laufbelastung auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im Skelettmuskel

In der Literatur finden sich eine Reihe von muskelspezifischen *microRNAs*, den sogenannten *myomiRs* (McCarthy, 2008, 2011; Winbanks et al., 2014). Zu dieser Gruppe gehören miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 und miR-208b (Horak et al., 2016). Darüber hinaus konnte eine Beeinflussung der miR-107 Spiegel im Skelettmuskel durch Training festgestellt werden (Güller & Russell, 2010; A. P. Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009). Aufgrund eines in unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten *Arrays* mit diversen miRNAs wurden zudem miR-20a, miR-20b und miR-29a zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

miR-1

Das Expressionsmuster von *miR-1* zeigte keine Veränderungen in Antwort auf eine Laufbelastung (*Abbildung 4-14*).

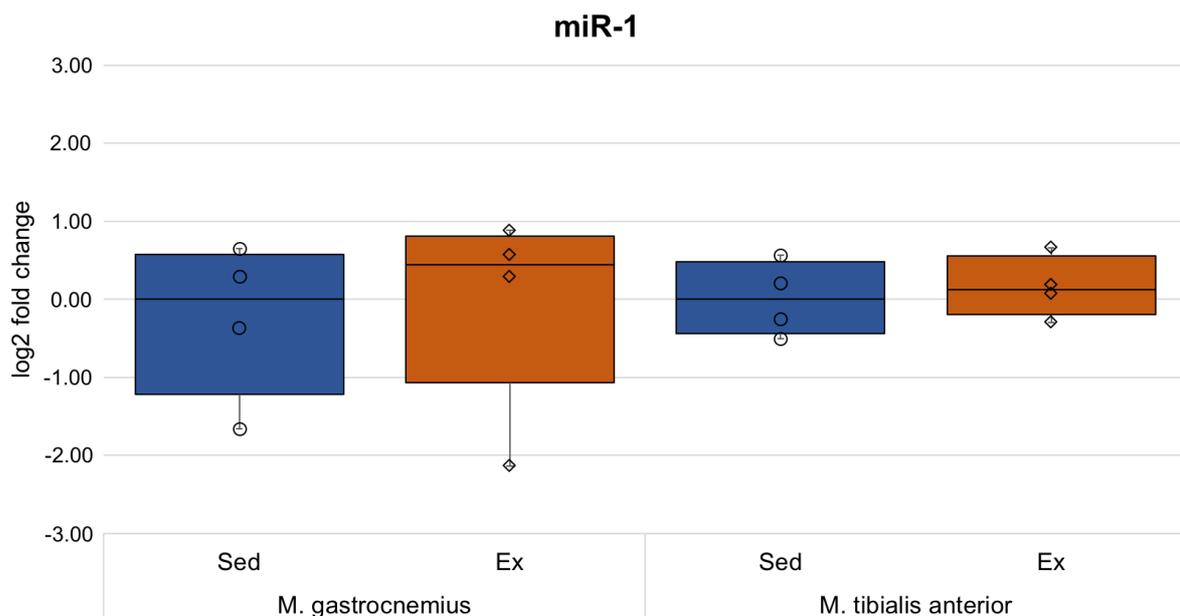


Abbildung 4-14: Analyse der Expression von miR-1 in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

miR-107

Für den *M. gastrocnemius* konnten unter Belastung keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden. Im *M. tibialis anterior* wiederum ließen sich signifikante Effekte nachweisen: Die Läufer zeigten höhere Gehalte an miR-107 (*Abbildung 4-15*).

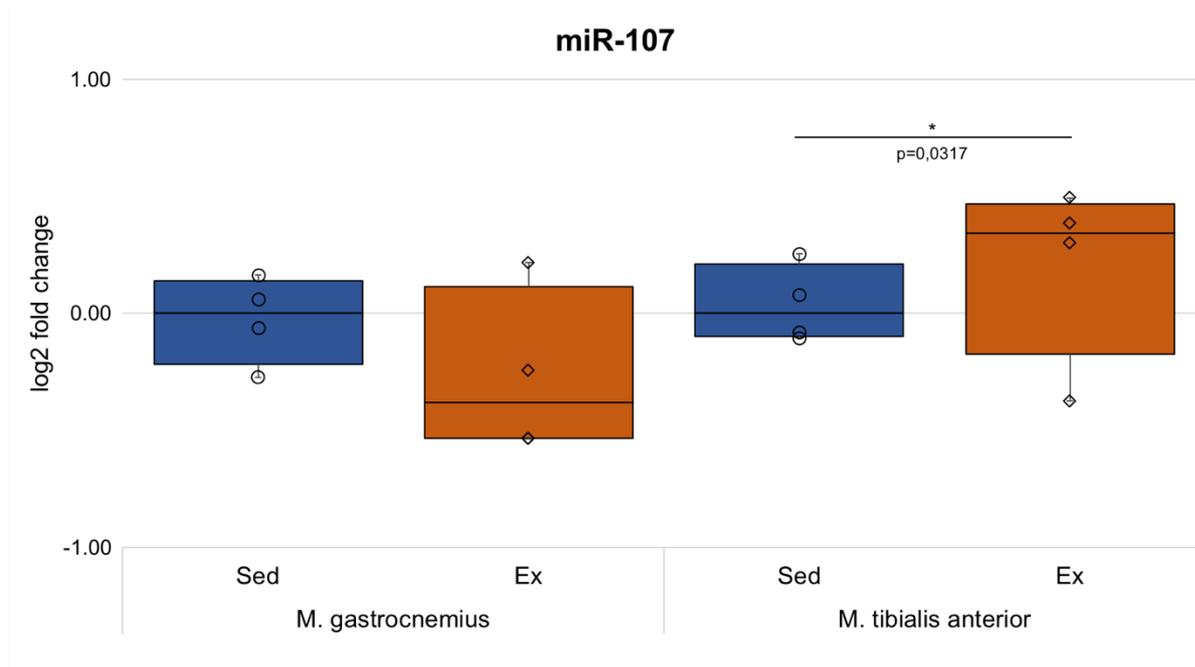


Abbildung 4-15: Analyse der Expression von miR-107 in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

miR-133a

Wie *Abbildung 4-16* zeigt, konnten für die Konzentration von miR-133a keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden.

miR-133b

Auch für die Expressionsmuster von *miR-133b* konnten keine Veränderungen beobachtet werden (*Abbildung 4-16*).

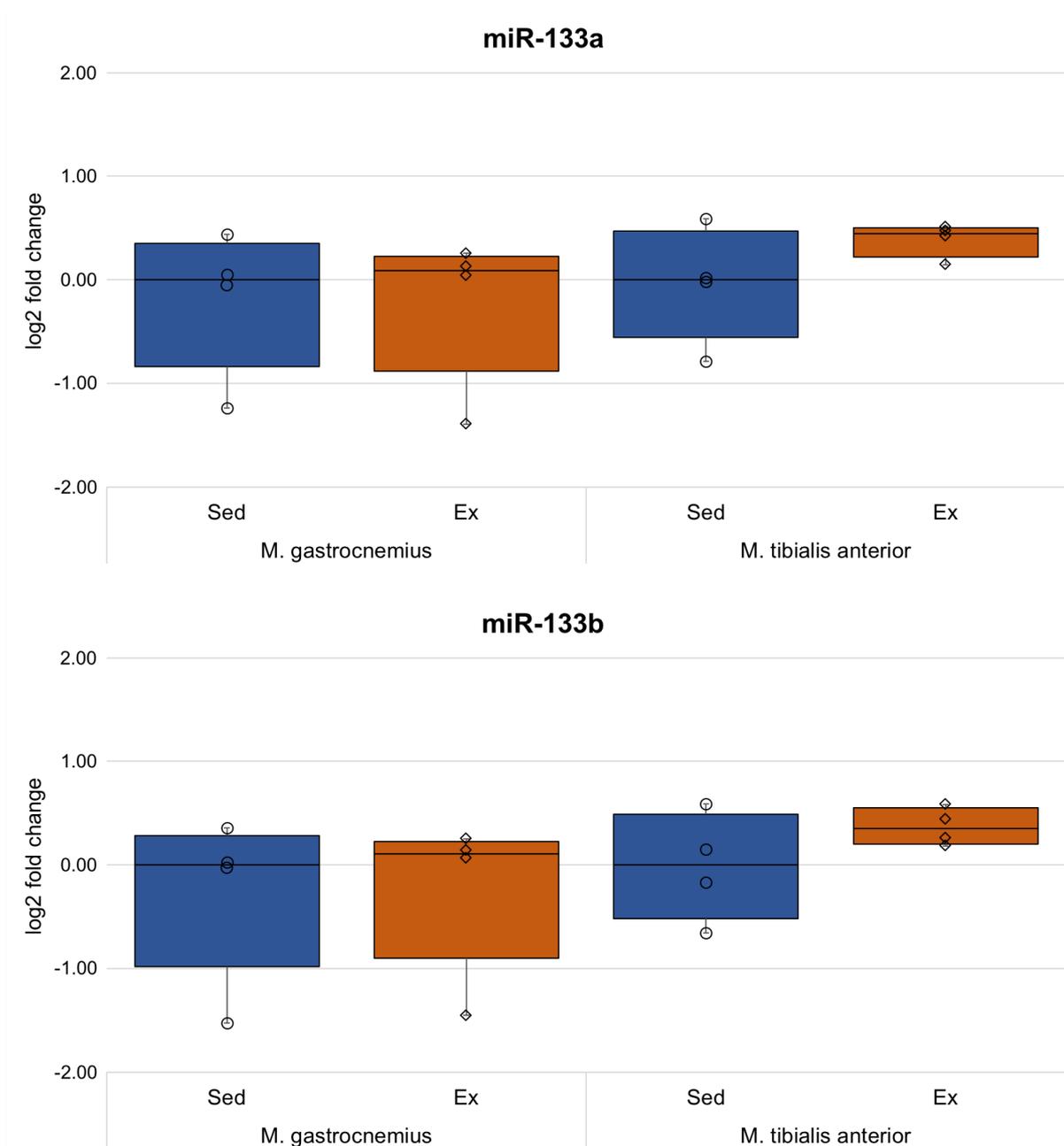


Abbildung 4-16: Analyse der Expression von miR-133a und miR-133b in Antwort auf eine Laufbelastung
Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

miR-206

Es waren bezüglich des Expressionsmusters der miR-206 in beiden untersuchten Muskeln keine Veränderungen zu beobachten (Abbildung 4-17).

miR-208b

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten für miR-208b im *M. gastrocnemius* keine Änderungen. Im *M. tibialis anterior* hingegen konnten bei den Läufern signifikant höhere Konzentrationen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind in *Abbildung 4-17* dargestellt.

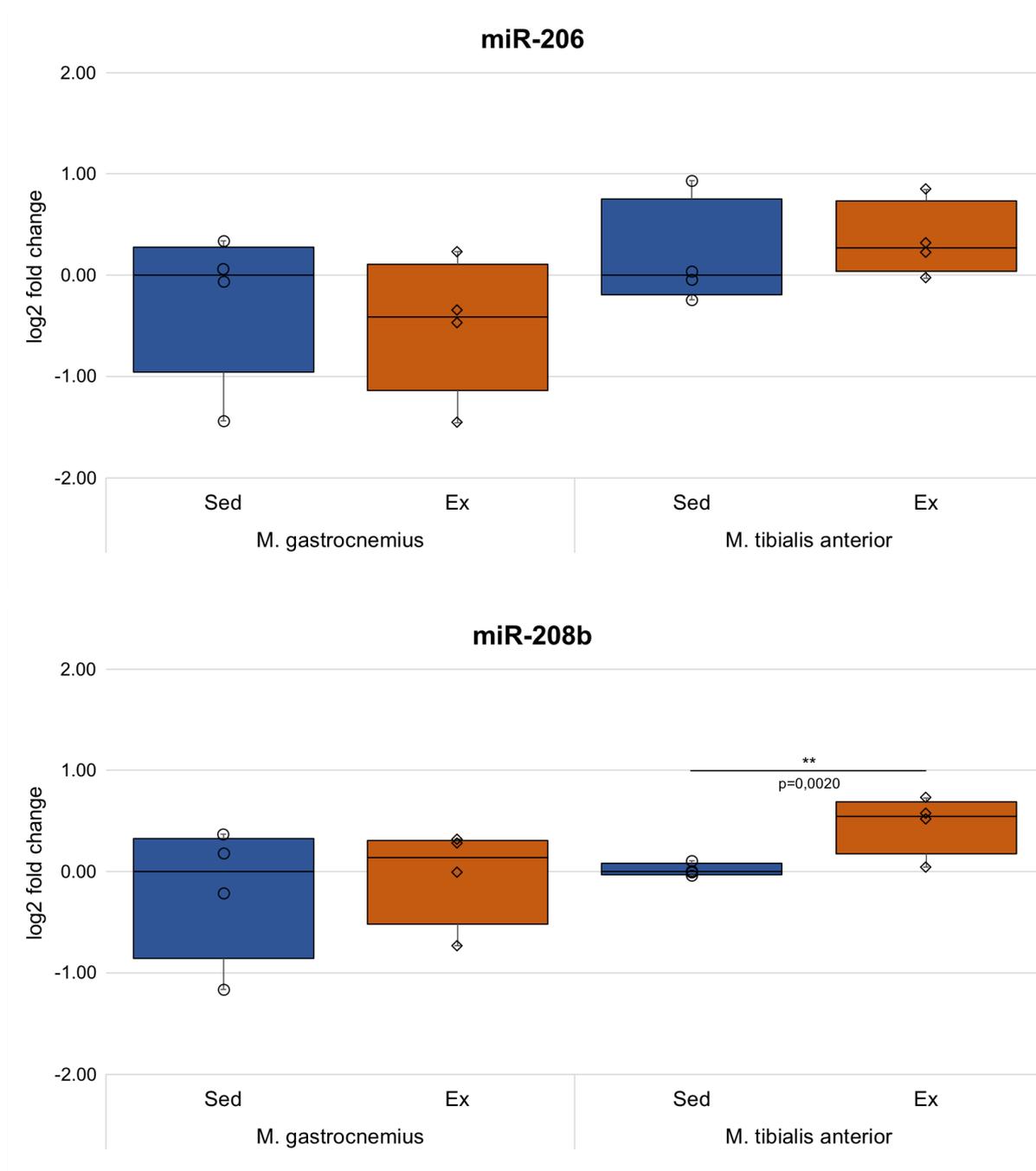


Abbildung 4-17: Analyse der Expression von miR-206 und miR-208b in Antwort auf eine Laufbelastung
Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

miR-20a

Für die Expression von *miR-20a* zeigten sich lediglich im *M. gastrocnemius* tendenzielle Veränderungen (Abbildung 4-18).

miR-20b

miR-20b zeigte keine Veränderungen in Antwort auf eine Laufbelastung (Abbildung 4-18).

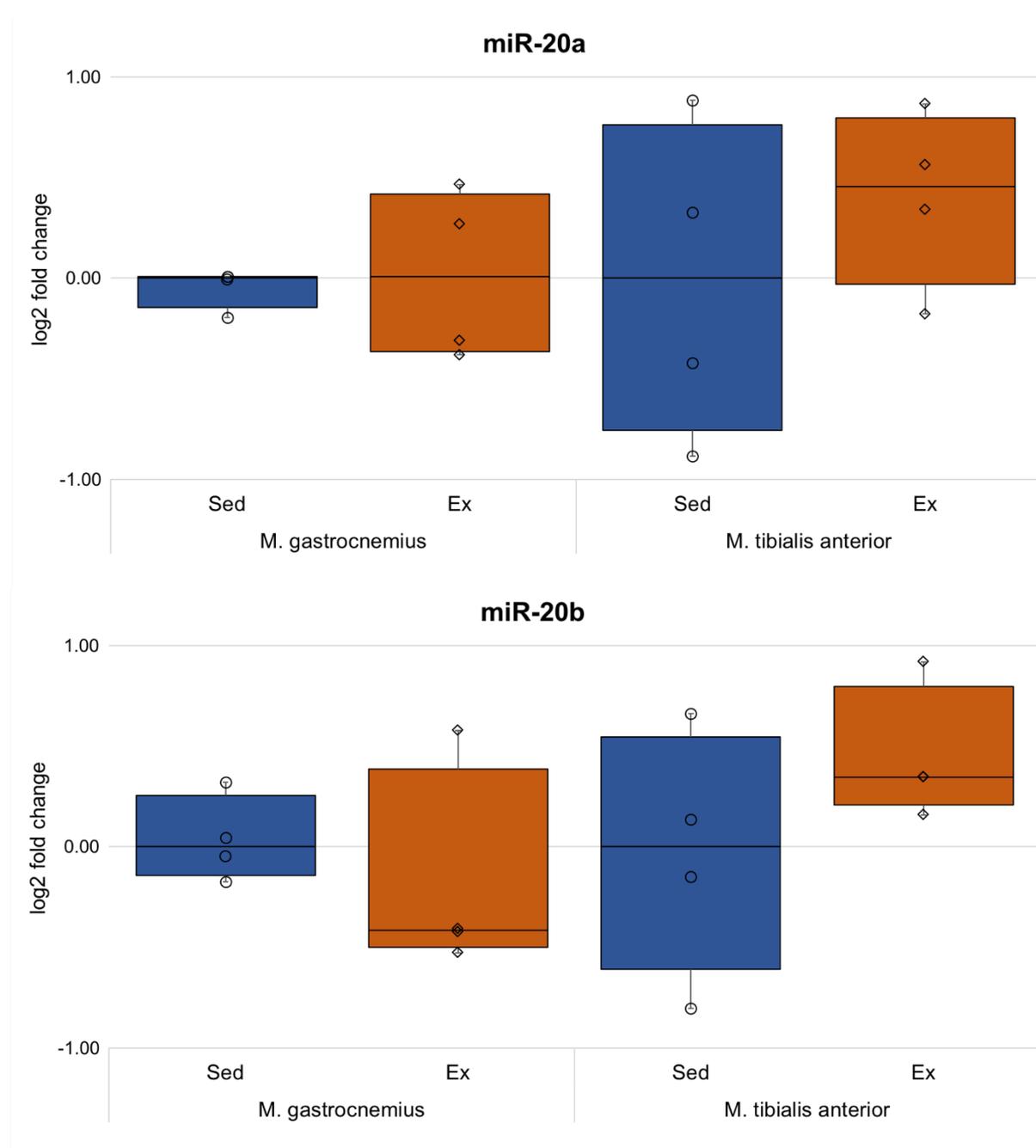


Abbildung 4-18: Analyse der Expression von miR-20a und miR-20b in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

miR-29a

Es konnten für keinen der beiden untersuchten Muskeln signifikante Effekte nachgewiesen werden (*Abbildung 4-19*).

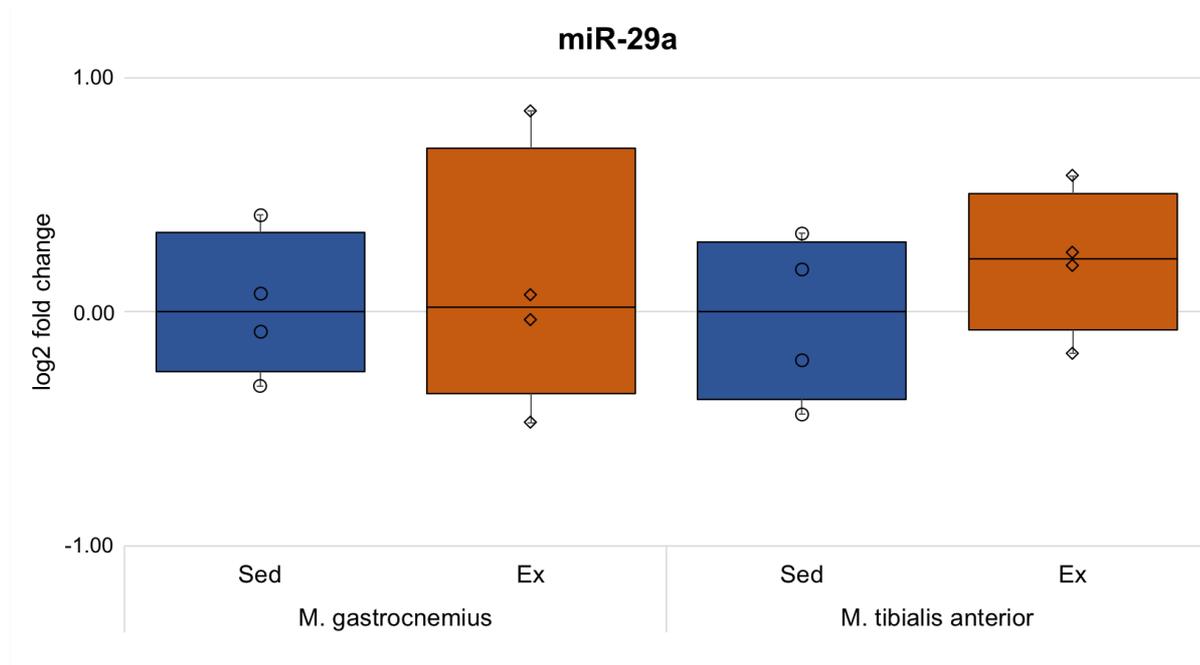


Abbildung 4-19: Analyse der Expression von miR-29a in Antwort auf eine Laufbelastung

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

4.3. Anpassungen des Skelettmuskels an ein mehrwöchiges Laufbandtraining

In vorhergehenden Versuchen der Arbeitsgruppe Munz konnten Proben aus einem zehnwöchigen Laufbandtraining gewonnen werden. Für die vorliegende Arbeit konnte dabei auf Proben des *M. tibialis anterior* und des *M. gastrocnemius*, sowohl von Läufern als auch von Nicht-Läufern zurückgegriffen werden. Die Muskeln wurden unmittelbar nach der Belastung entnommen und sofort in *RNAlater*® fixiert.

4.3.1. Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene

Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Expression von Genen, die mit Inflammation, Anti-Inflammation und zellulärem Stress assoziiert sind

Il-6-r

Die *Il-6-r*-mRNA-Konzentration zeigte im *M. gastrocnemius* einen Trend hin zu einer Erhöhung nach Lauftraining. Im *M. tibialis anterior* konnten auch keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (*Abbildung 4-20*).

Zfp36

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen konnte weder im *M. gastrocnemius*, noch im *M. tibialis anterior* eine signifikant veränderte Expression des *Zfp36*-Gens in der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Kontrollgruppe auf RNA-Ebene festgestellt werden (*Abbildung 4-20*).

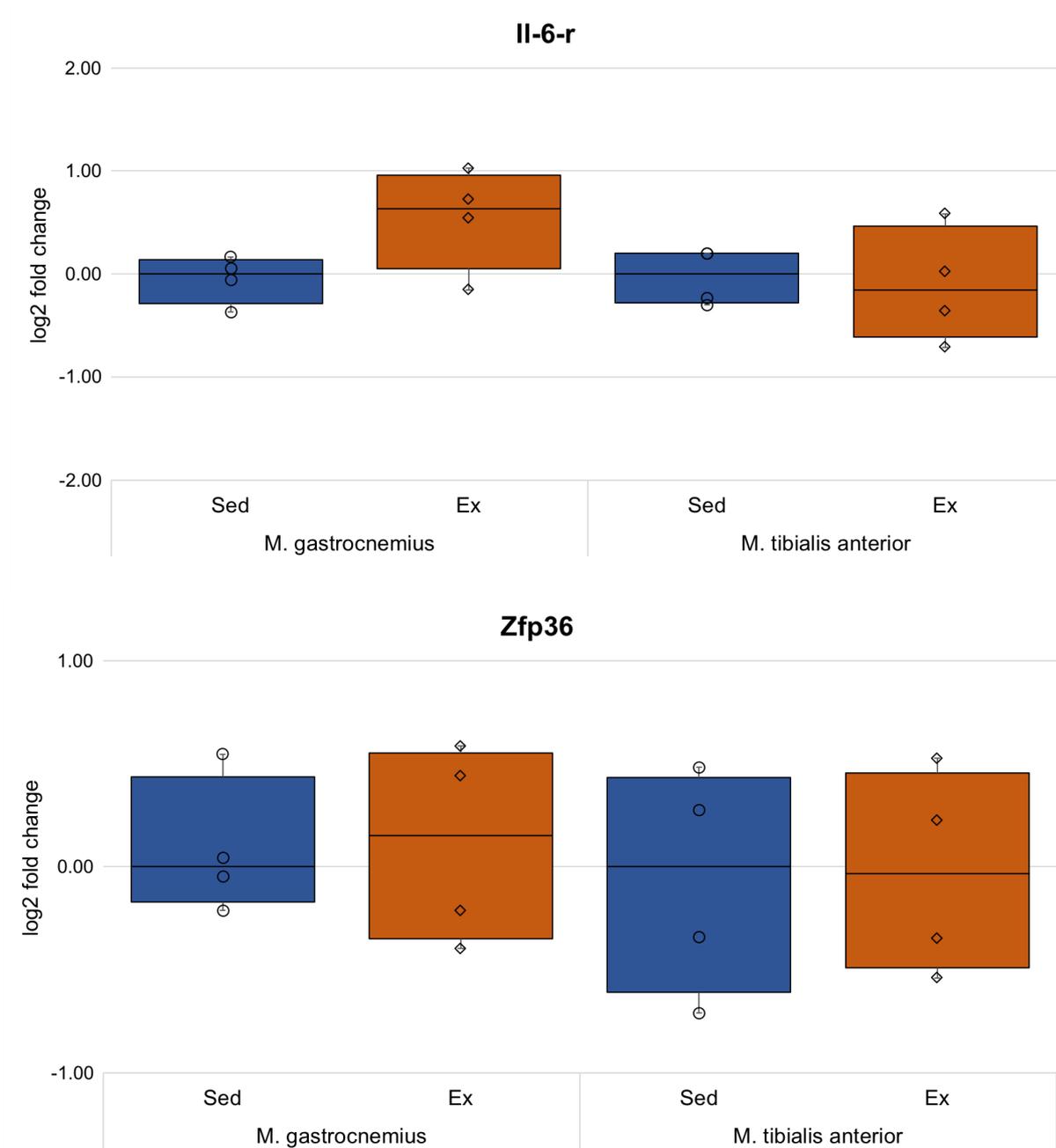


Abbildung 4-20: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene *Il-6-r* und *Zfp36* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

Ho1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei einem zehnwöchigen Laufbandtraining keine signifikante Veränderung der Ho1-mRNA-Konzentrationen im *M. gastrocnemius* oder im *M. tibialis anterior* in der Gruppe der Läufer beobachtet werden (Abbildung 4-21).

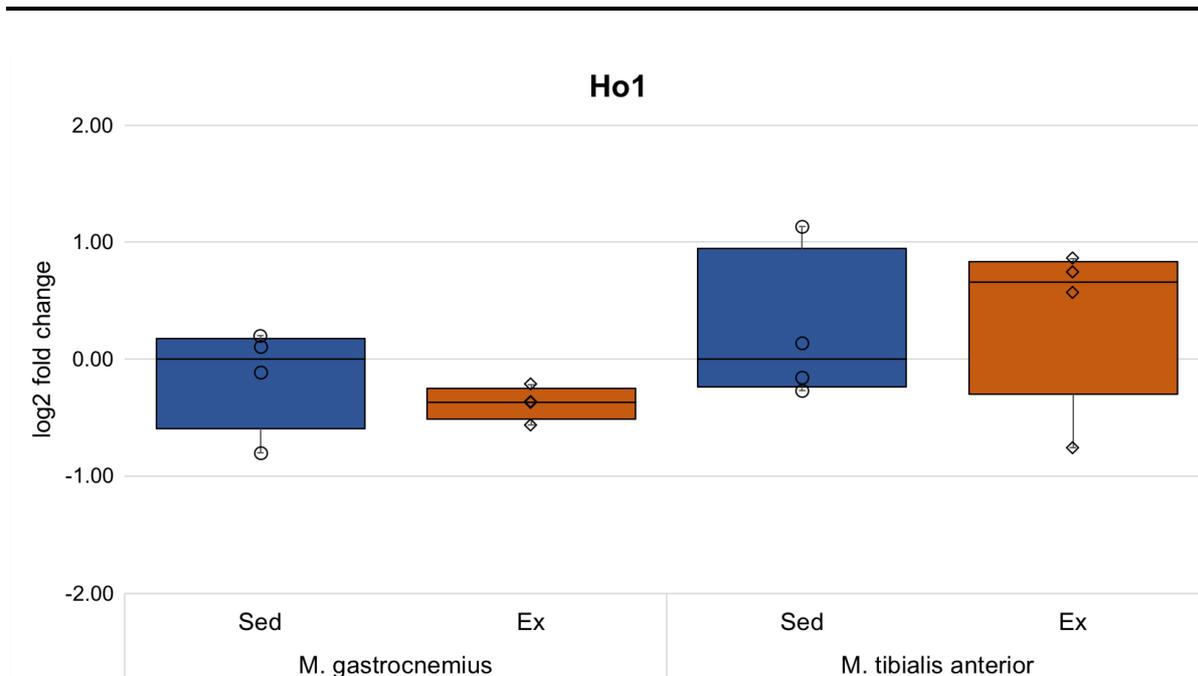


Abbildung 4-21: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens *Ho1* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Expression von Genen, die für metabolische und mitochondriale Marker kodieren

Ucp3

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten auf RNA-Ebene keine signifikanten Veränderungen der *Ucp3*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4-22).

Cox4

Für *Cox4* konnte im *M. gastrocnemius* ein Trend hin zu einer erhöhten mRNA Konzentration für die Gruppe der Läufer im Vergleich zu den Nicht-Läufern festgestellt werden. Dieser Effekt zeigte sich im *M. tibialis anterior* jedoch nicht (Abbildung 4-22).

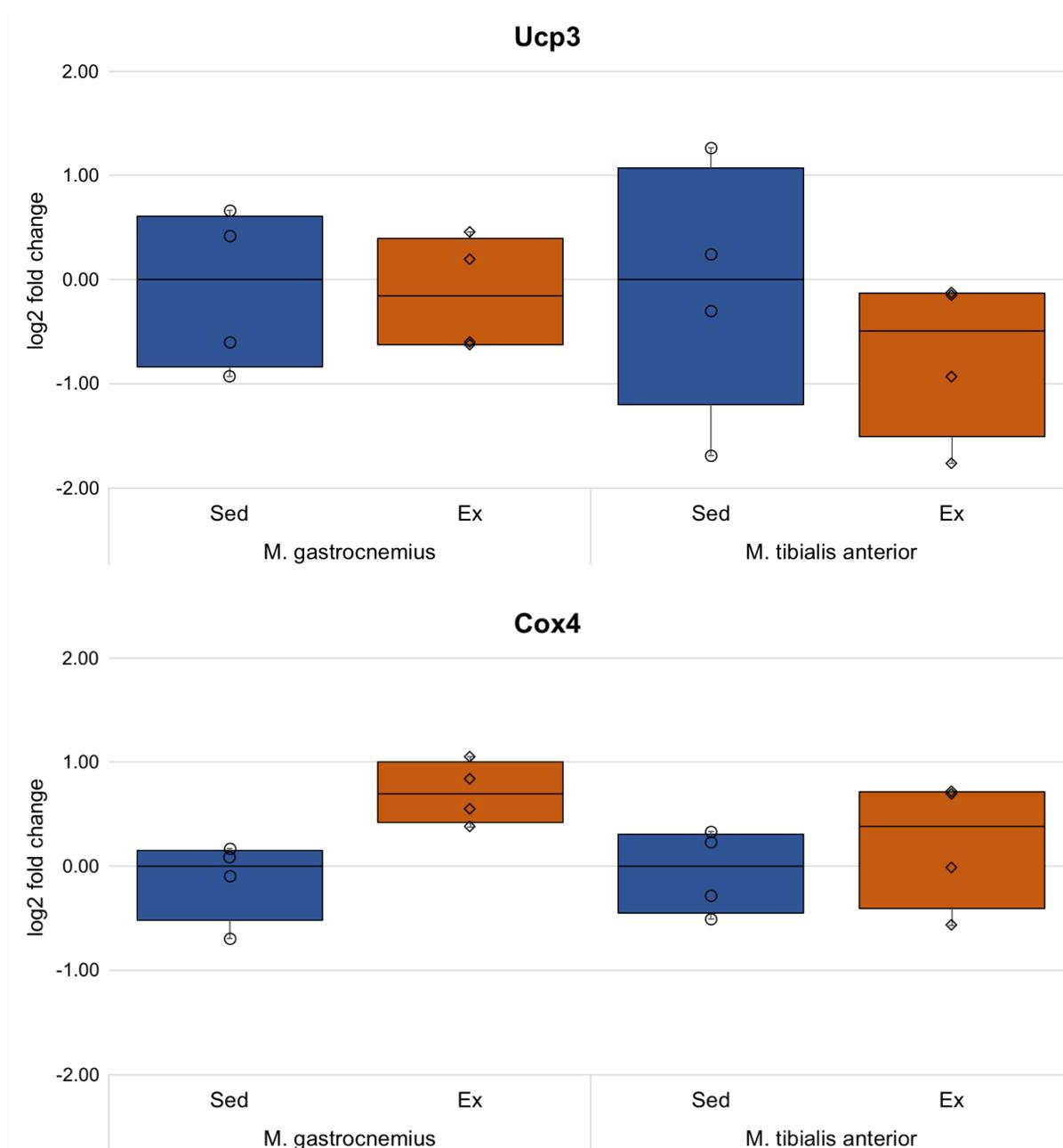


Abbildung 4-22: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene *Ucp3* und *Cox4* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining
Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Pgc-1α

Es konnte im *M. gastrocnemius* ein Trend hin zu einer erhöhten Konzentration von *Pgc-1α*-mRNA durch Training beobachtet werden. Dieser Effekt konnte im *M. tibialis anterior* allerdings nicht beobachtet werden (*Abbildung 4-23*).

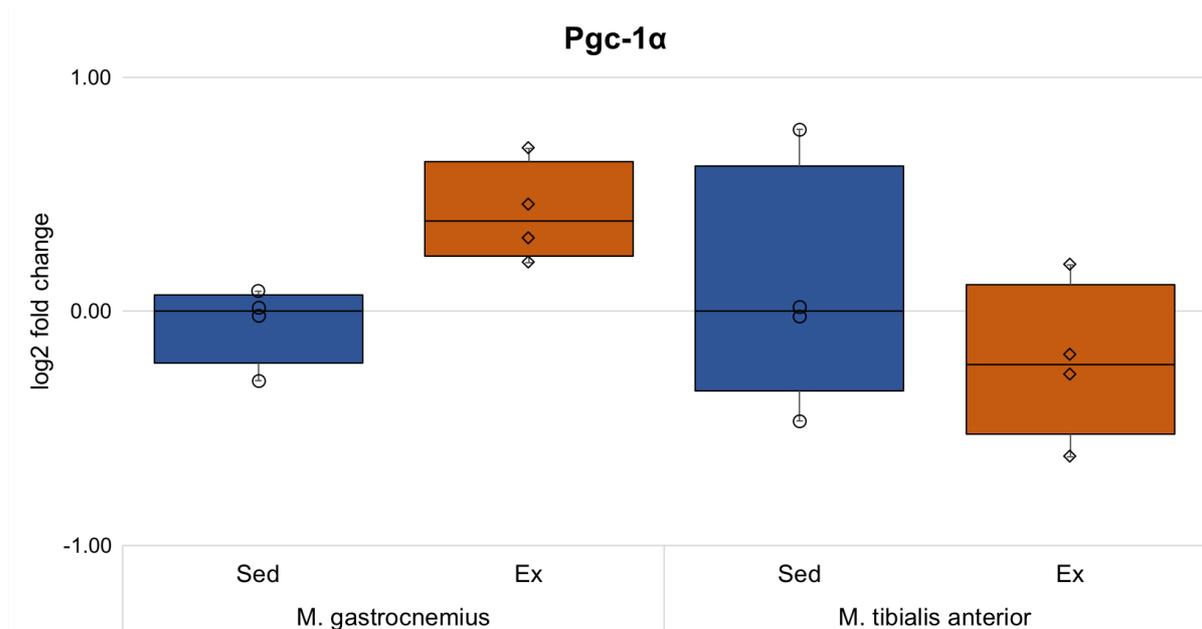


Abbildung 4-23: Analyse der Expression des mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gens *Pgc-1α* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren

Es konnten weder im *M. gastrocnemius* noch im *M. tibialis anterior*, signifikante Veränderungen in den mRNA-Konzentrationen von Myh1, MyH2 und Myh7 nachgewiesen werden (*Abbildung 4-24* und *4-25*).

Für *Actn3* war ebenfalls in den beiden untersuchten Muskeln kein Effekt zu beobachten (*Abbildung 4-25*).

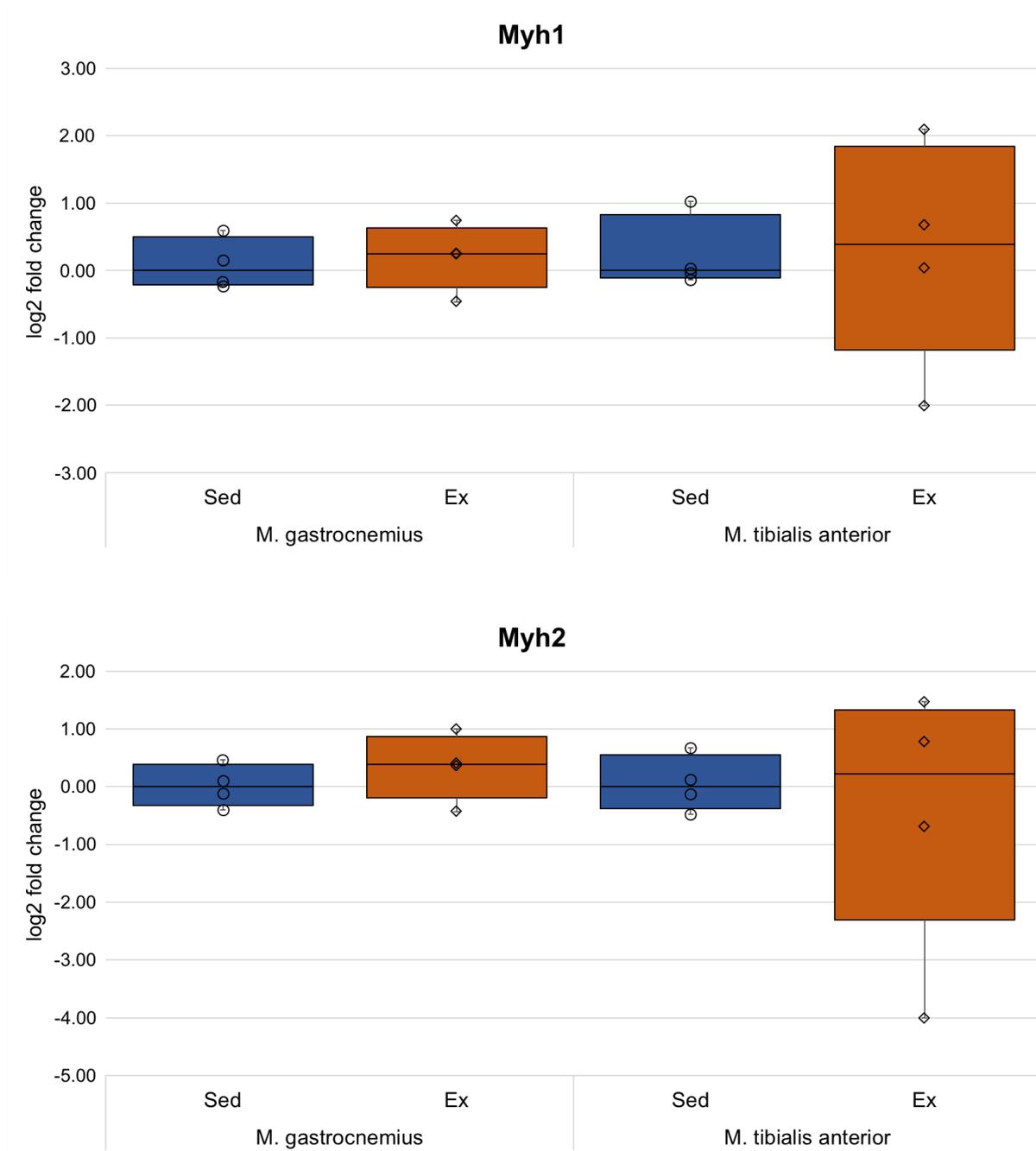


Abbildung 4-24: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene *Myh1* und *Myh2* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

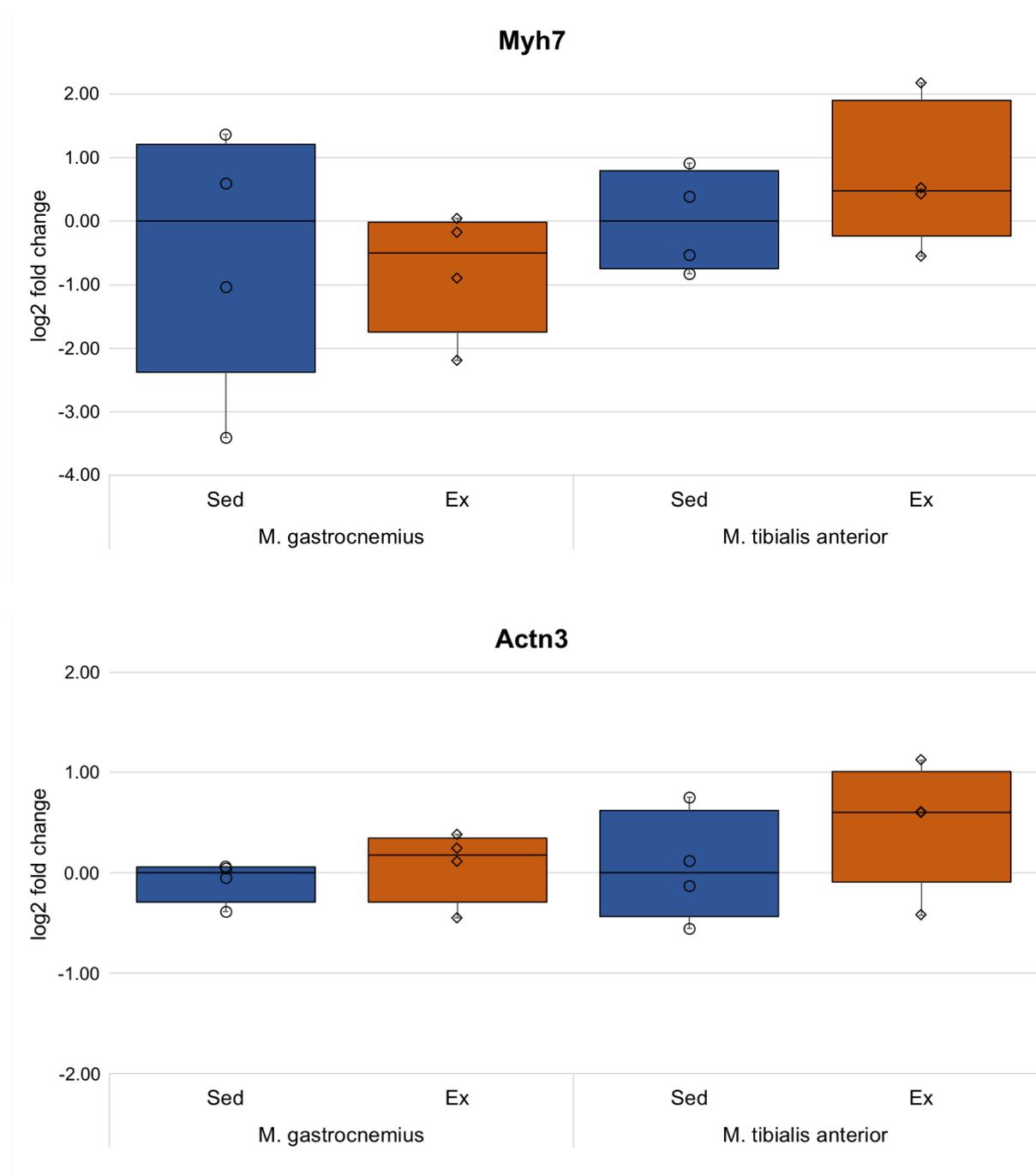


Abbildung 4-25: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene *Myh7* und *Actn3* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Expression von Genen, die mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziiert sind

Mstn

In keinem der beiden untersuchten Muskeln konnten signifikant veränderte Konzentrationen von Mstn-mRNA in der Gruppe der Läufer nachgewiesen werden (*Abbildung 4-26*).

Murf1

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei den Mäusen, die ein zehnwöchiges Laufbandtraining absolviert hatten im *M. gastrocnemius* lediglich ein Trend zur Absenkung der *Murf1*-mRNA-Konzentration unter Training beobachtet werden. Im *M. tibialis anterior* war dieser Effekt nicht zu beobachten (*Abbildung 4-26*).

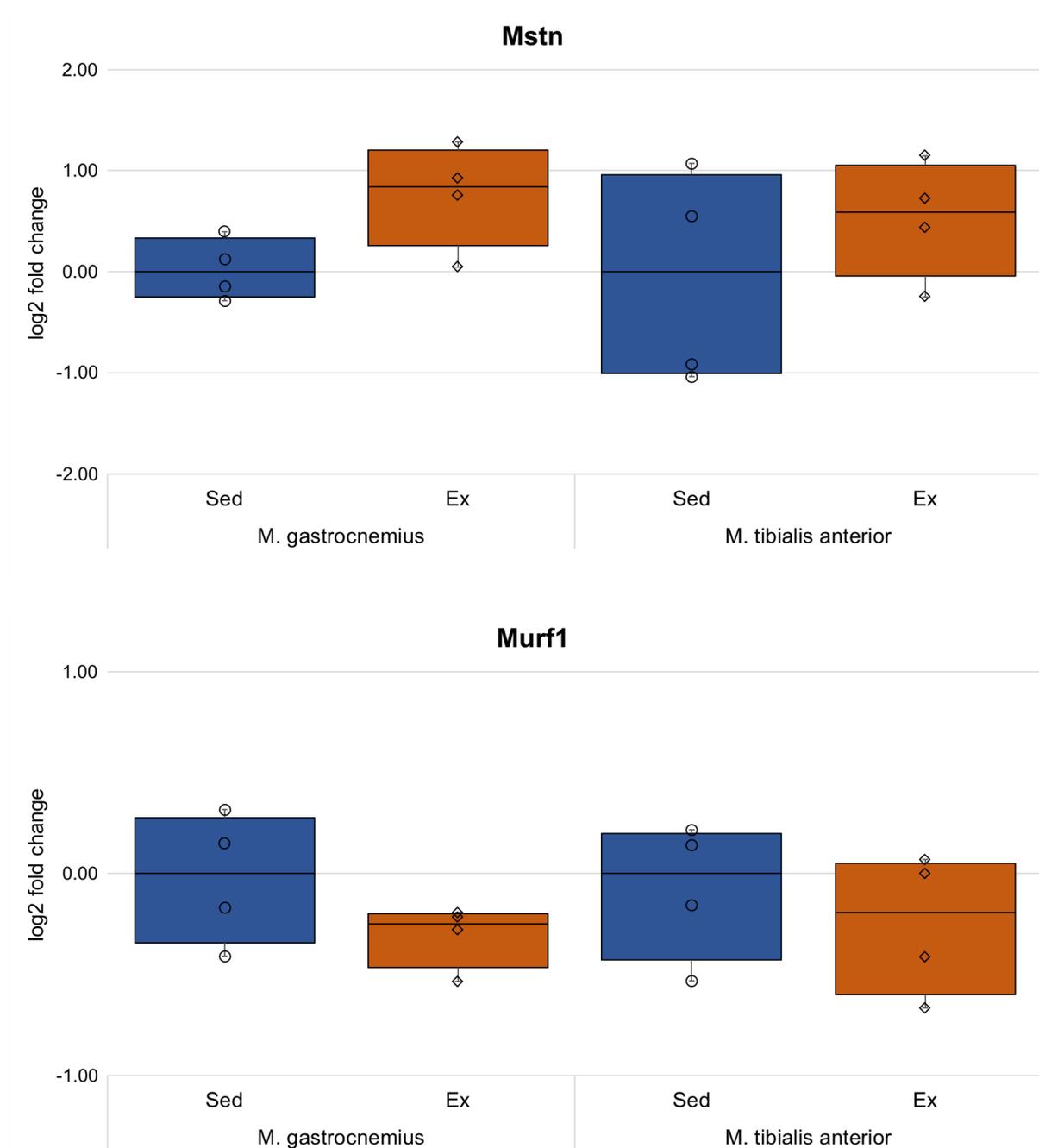


Abbildung 4-26: Analyse der Expression der mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gene *Mstn* und *Murf1* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Expression von Genen, die für Faktoren kodieren, die an der miRNA-Biogenese beteiligt sind

Drosha, Dgcr8, Dicer1, Xpo5

Bei keinem der untersuchten Gene konnte eine signifikante Veränderung in den untersuchten Muskeln, *M. gastrocnemius* und *M. tibialis anterior*, festgestellt werden (Abbildung 4-27 und 4-28).

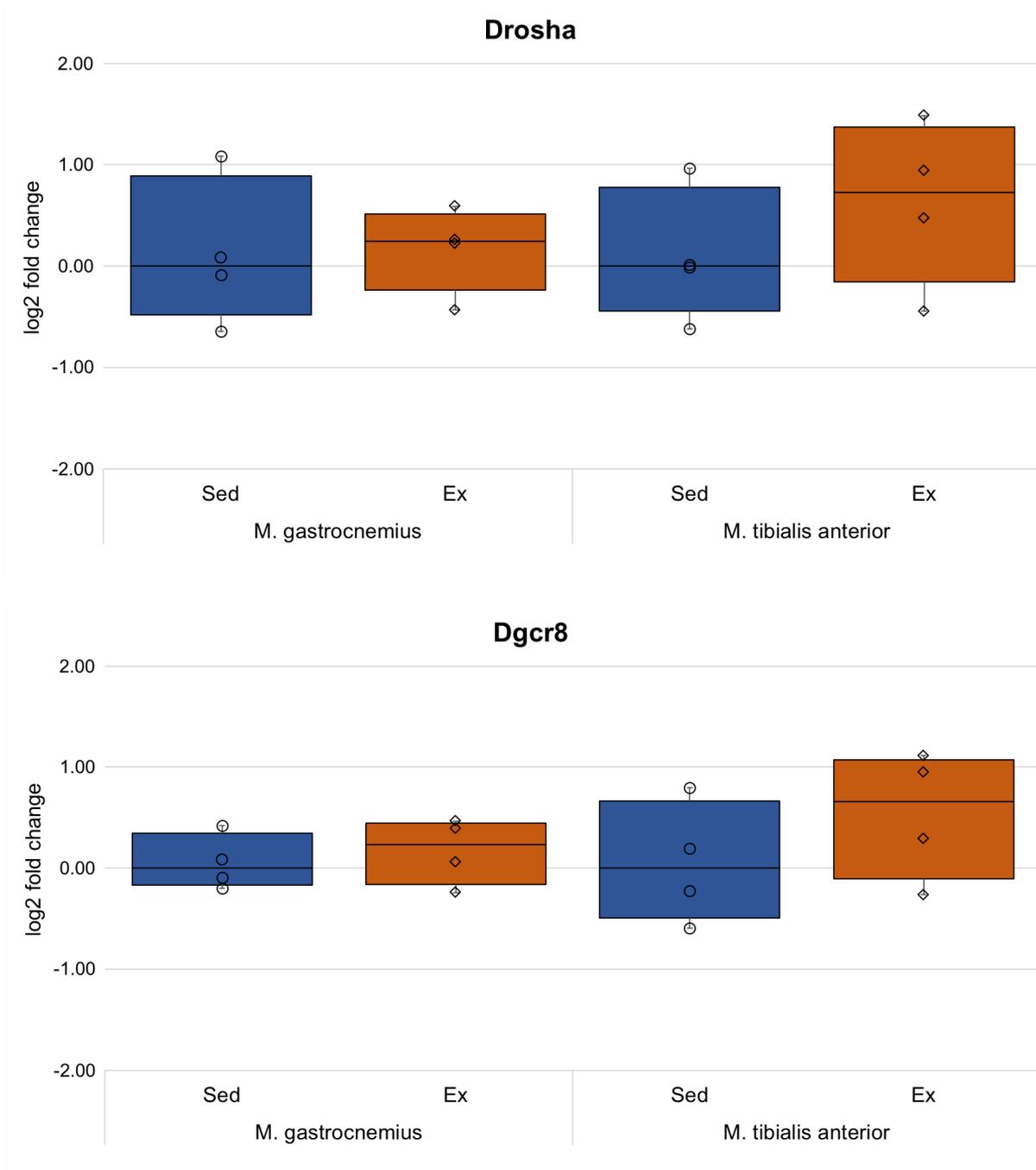


Abbildung 4-27: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Drosha* und *Dgcr8* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

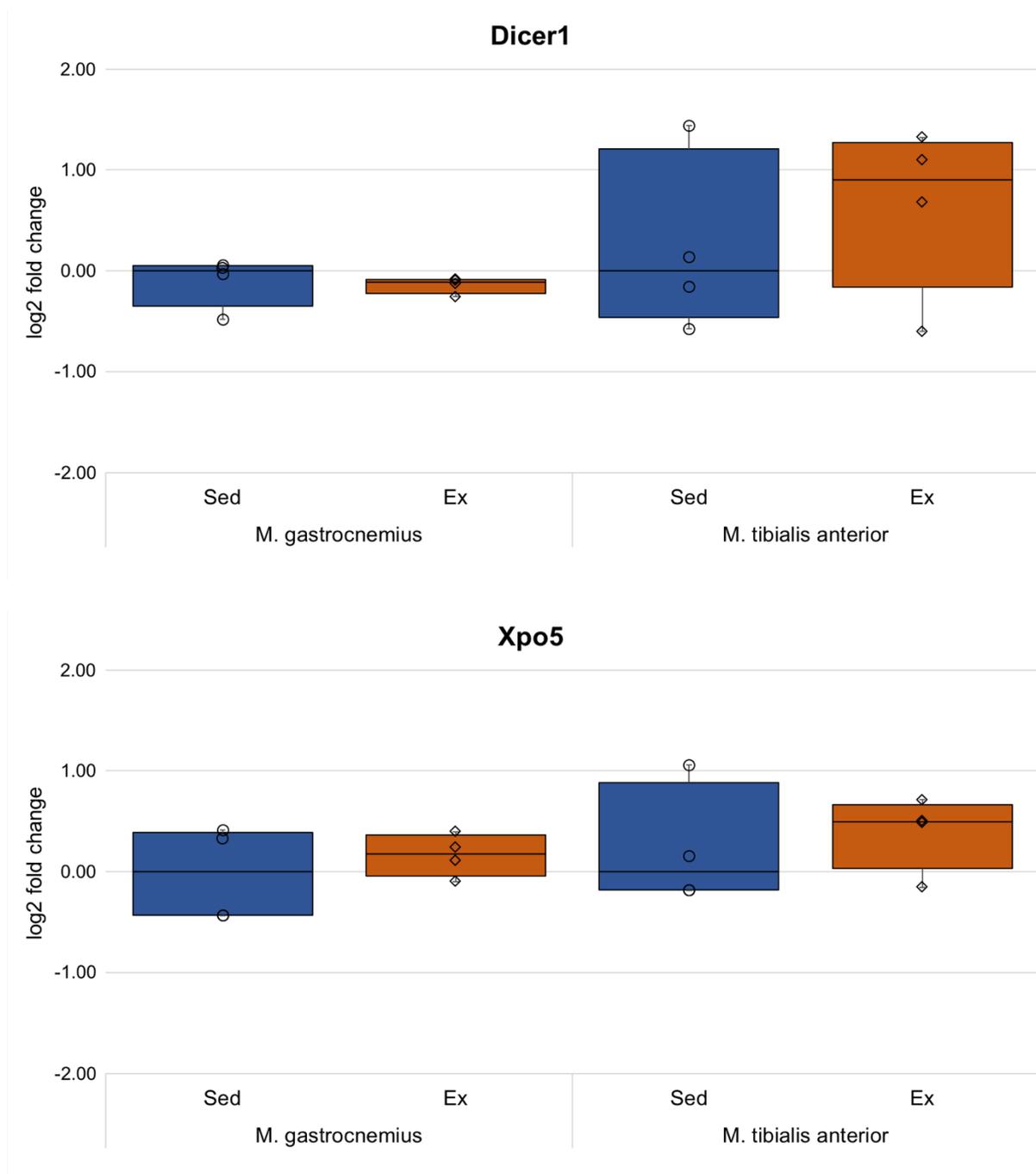


Abbildung 4-28: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Dicer11* und *Xpo5* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

4.3.2. Einfluss eines zehnwöchigen Laufbandtrainings auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im Skelettmuskel

Für keine der untersuchten miRNAs (miR-1, miR-107, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b, miR-20a, miR-20b, miR-29a) konnten signifikant veränderte Konzentrationen festgestellt werden. Dies war bei beiden untersuchten Muskeln der Fall (*Abbildung 4-29 bis 4-33*).

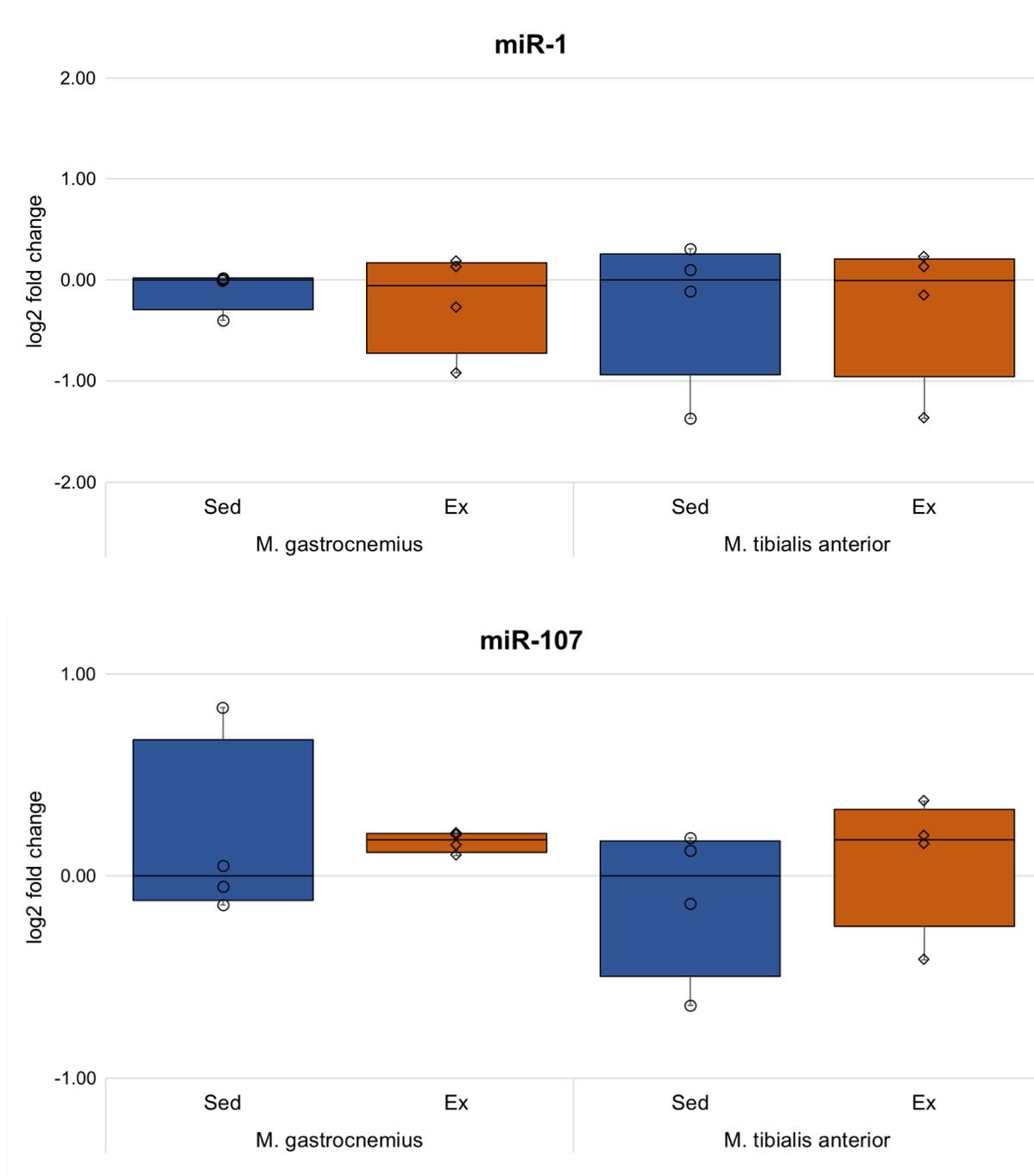


Abbildung 4-29: Analyse der Expression von miR-1 und miR-107 in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

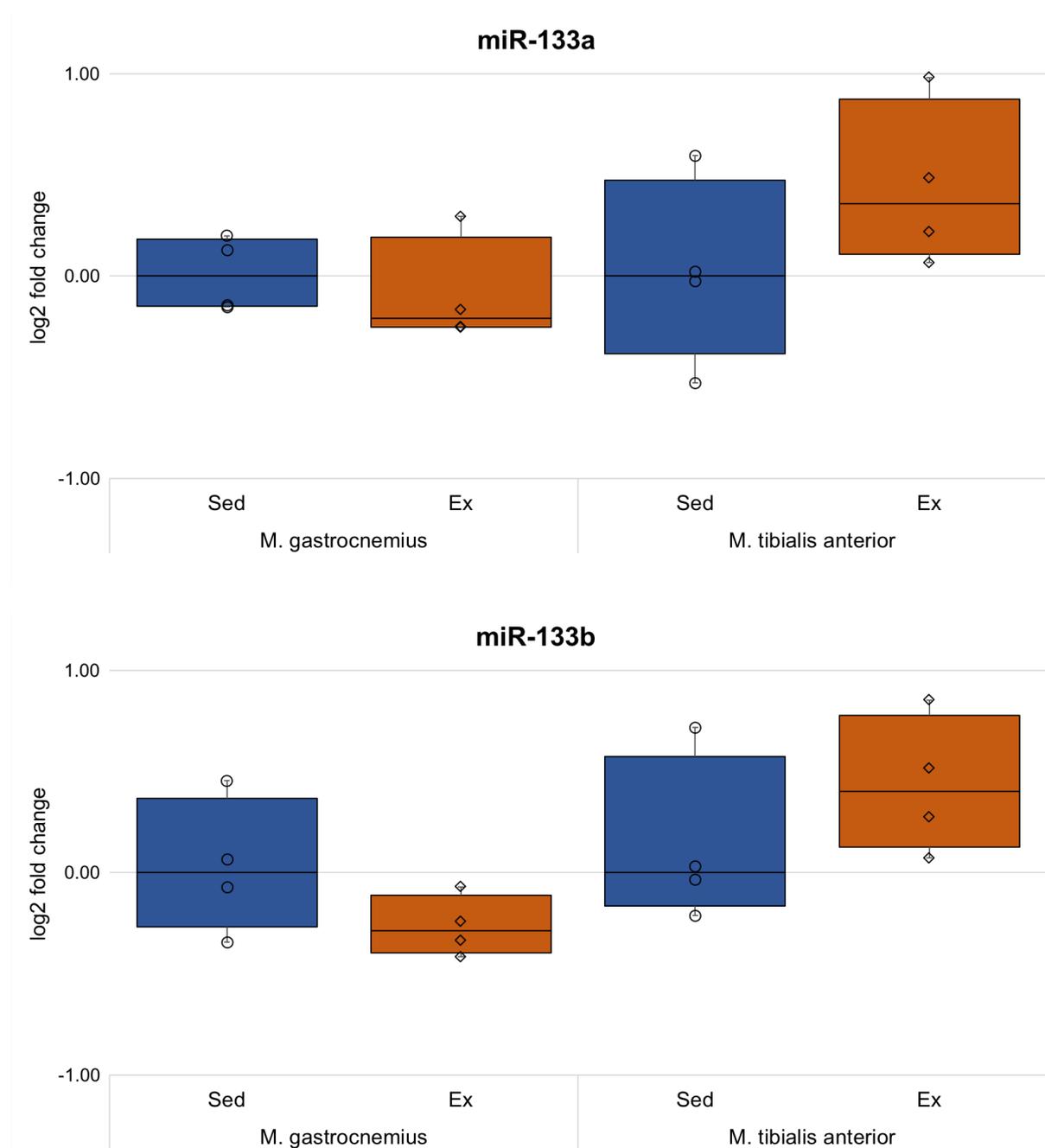


Abbildung 4-30: Analyse der Expression von miR-133a und miR-133b in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

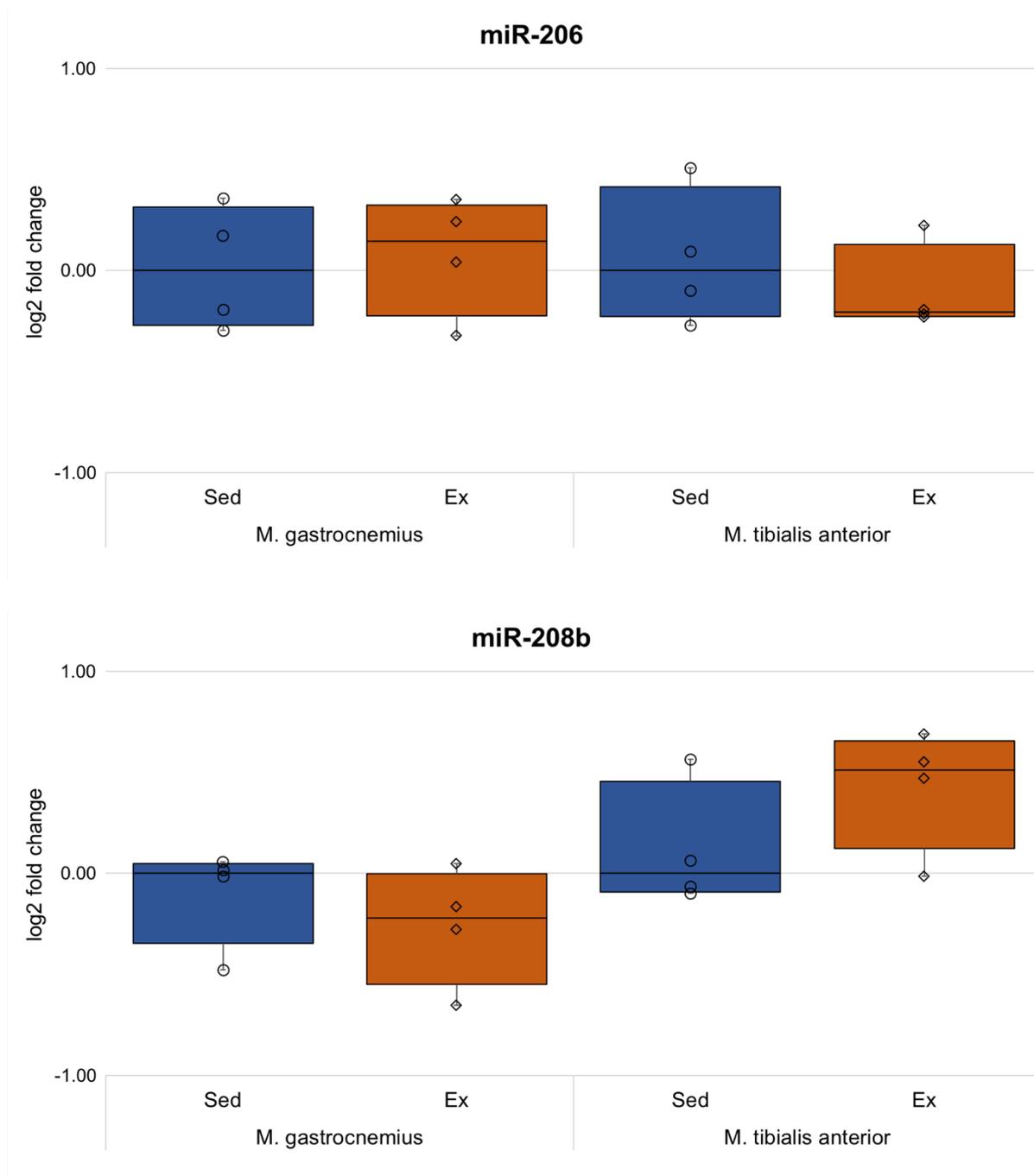


Abbildung 4-31: Analyse der Expression von miR-206 und miR-208b in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

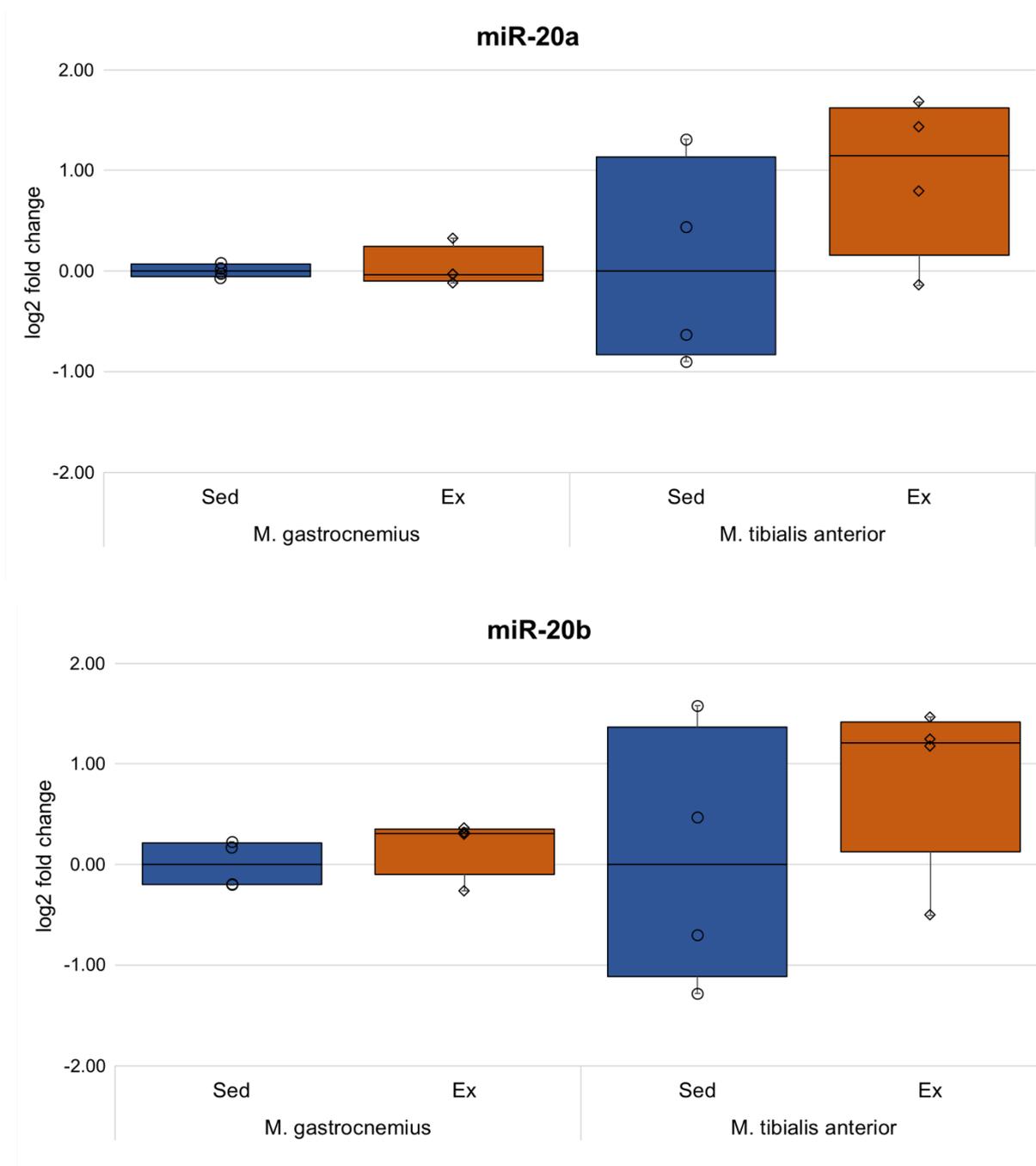


Abbildung 4-32: Analyse der Expression von miR-20a und miR-20b in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

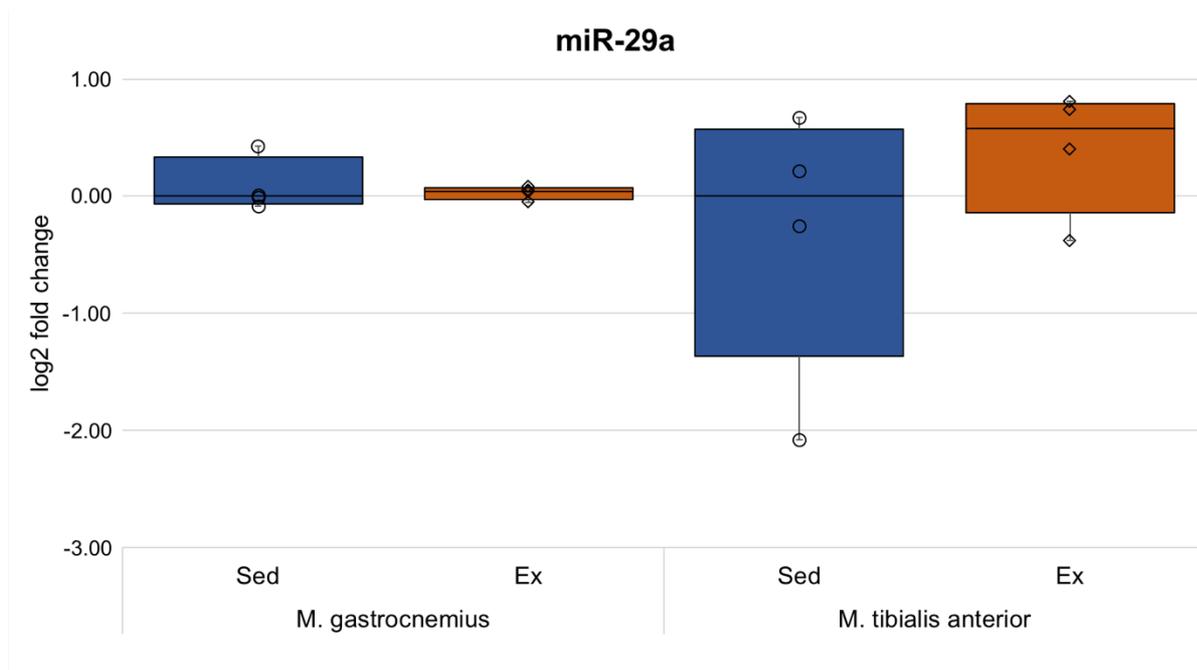


Abbildung 4-33: Analyse der Expression von miR-29a in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining
Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

4.4. Anpassungen des Skelettmuskels an ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Im Rahmen der Versuche für diese Arbeit wurden Skelettmuskelproben von Mäusen gewonnen, die zuvor ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining absolviert hatten. Wie bereits unter 3.2.1.3. beschrieben, wurden dabei der *M. tibialis anterior* und der *M. gastrocnemius* der linken Hintergliedmaße präpariert und sofort in *RNAlater*® fixiert.

4.4.1. Phänotypische Veränderungen im Versuch

Die in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten männlichen Mäuse wurden mit einem Alter von sieben Wochen angeliefert und für die Versuche mit acht Wochen eingesetzt. Zu Beginn des Versuchs betrug das durchschnittliche Gewicht der Läufer $22,7 \pm 0,9$ g und der Nicht-Läufer $23,8 \pm 0,4$ g, bei Beendigung des Versuchs bei den Läufern $28,9 \pm 2,4$ g, bei den Nicht-Läufern $29,5 \pm 1,4$ g. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Bei

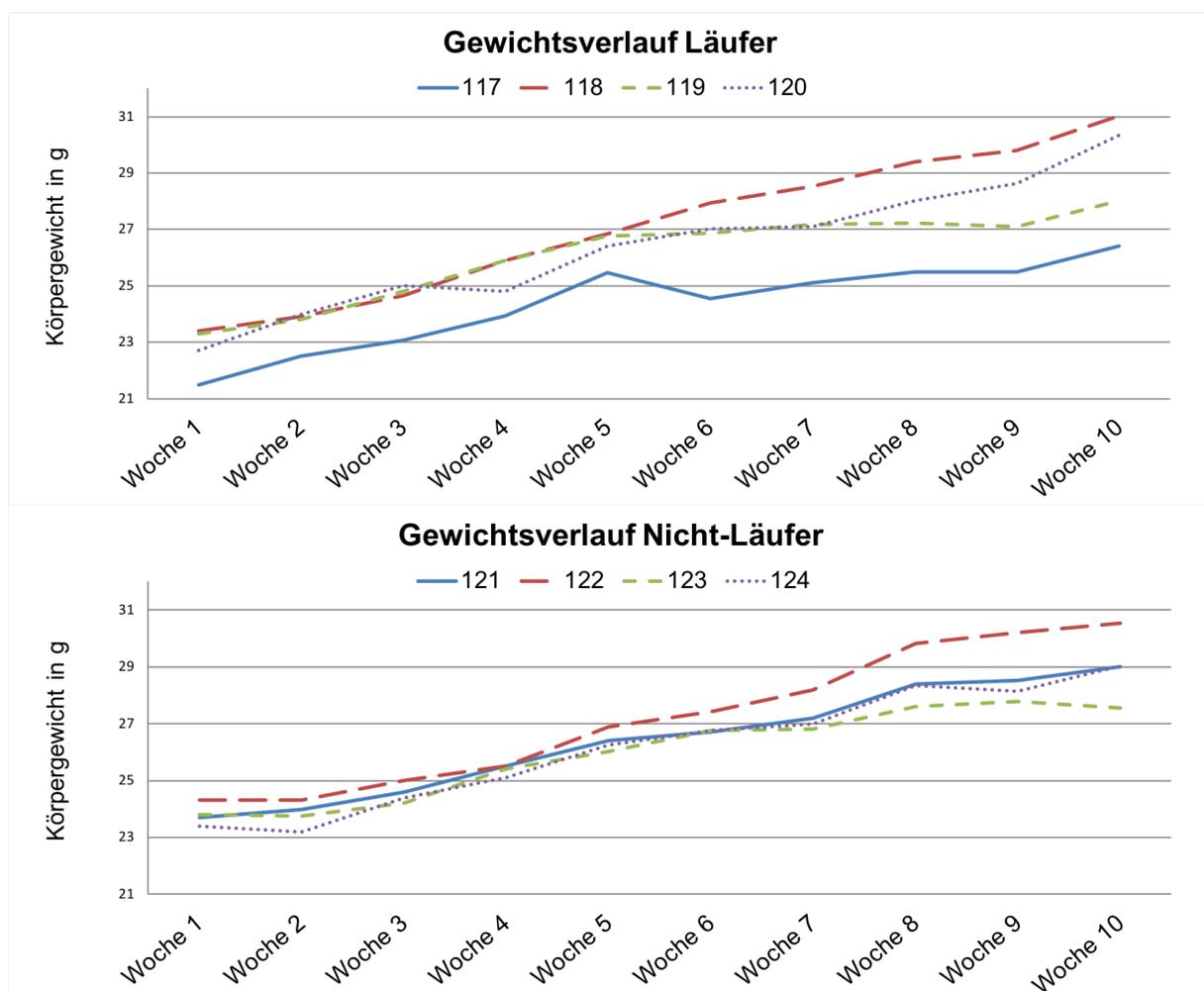


Abbildung 4-34: Gewichtsverlauf der Versuchstiere innerhalb der zehnwöchigen Versuchsdauer
Die Mäuse wurden dabei einmal wöchentlich gewogen und das Gewicht entsprechend aufgezeichnet.

der Gruppe der Läufer konnten schon vor Beginn des Experiments größere Unterschiede im Gewicht verzeichnet werden als in der Gruppe der Nicht-Läufer.

Die Gewichtszunahme der Nicht-Läufer betrug im Durchschnitt 5,75 g, die der Läufer 6,25 g und war damit (nicht signifikant) höher.

Subjektiv erschienen die präparierten Muskeln bei den Läufern hypertroph. Nach Präparation und Wägen der einzelnen Muskeln konnte ein durchschnittliches Gewicht des *M. tibialis anterior* bei den Läufern von 0,063 g, bei den Nicht-Läufern von 0,050 g festgestellt werden. Das Muskelgewicht bei den Läufern war nicht signifikant höher als bei den Nicht-Läufern ($p=0,07$). Das Gewicht des *M. gastrocnemius* zeigte nur geringe Unterschiede. Bei den Läufern betrug es 0,170 g, bei den Nicht-Läufern 0,165 g und war damit ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

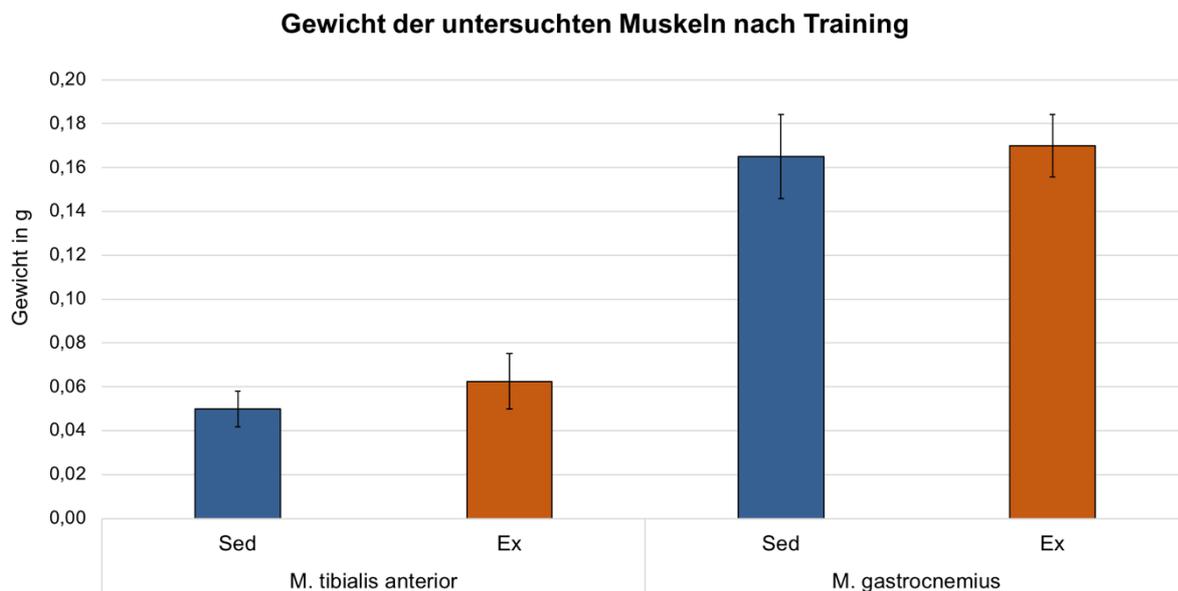


Abbildung 4-35: Vergleich des Gewichts der untersuchten Muskeln

4.4.2. Laufleistung während des Versuchs

Über die gesamte Zeit des Experiments wurden die Käfige der Läufer mit einem Laufrad bestückt, welches wiederum mit einem Tachometer verbunden war. So wurde über den gesamten Zeitraum die Laufleistung aufgezeichnet.

Die insgesamt gelaufenen Kilometer sind in *Tabelle 4-1* und in *Abbildung 4-36* dargestellt. Auffällig war vor allem, dass sich die Laufleistung zum Teil deutlich steigerte, wenn die Käfige der Tiere im unteren Teil des Regals standen. Dies wird vor allem auch in *Abbildung 4-37* deutlich. Hier ist der Tag des Positionswechsels im Regal als rote Säule

gekennzeichnet. Zudem gab es bei der täglich gemessenen Laufleistung zum Teil deutliche Schwankungen.

Insgesamt wirkten die Tiere der Läufer-Gruppe bei der Handhabung durch den Experimentator deutlich ausgeglichener und weniger aggressiv als jene der Nicht-Läufer-Gruppe.

		Maus			
		117	118	119	120
gelaufene insgesamt	km	663,3	741,3	213,0	568,6
Mittelwert	km/Tag	9,5	10,6	3,0	8,0
Käfigposition Regal Woche 1-5	im	oben	unten	oben	unten
Mittelwert	km/Tag	6,7	11,2	2,8	11,2
Käfigposition Regal Woche 6-10	im	unten	oben	unten	oben
Mittelwert	km/Tag	12,4	9,9	3,2	4,8

Tabelle 4-1: Laufleistung Im Laufrad während der zehnwöchigen Versuchsdauer

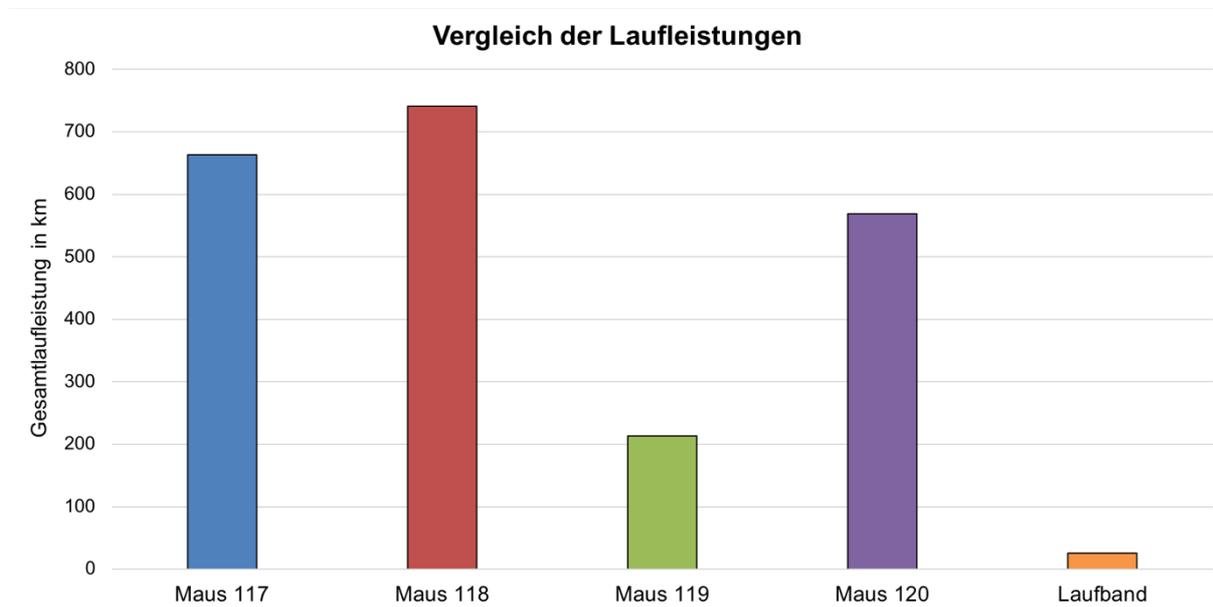


Abbildung 4-36: Vergleich der Laufleistungen

Bei einer Geschwindigkeit des Laufbandes von 24cm/sec (= 0,864km/h), einer Trainingszeit von einer Stunde an drei Tagen pro Woche und einer Gesamtdauer von zehn Wochen ergibt sich eine rechnerische Gesamtlauflistung der Laufband-Läufer von 26 km. Im Vergleich dazu legten *Maus 117* 663 km, *Maus 118* 741 km, *Maus 119* 213 km und *Maus 120* 569 km in zehn Wochen zurück.

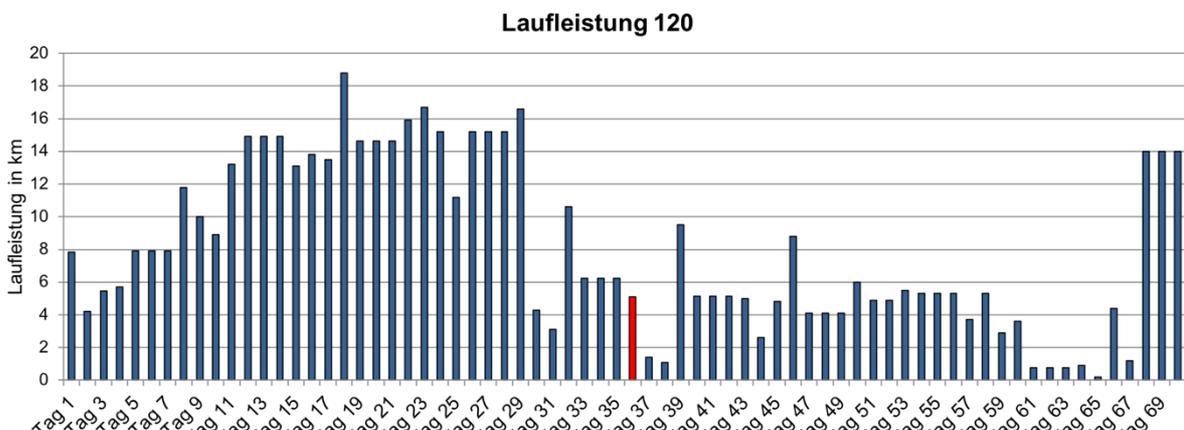
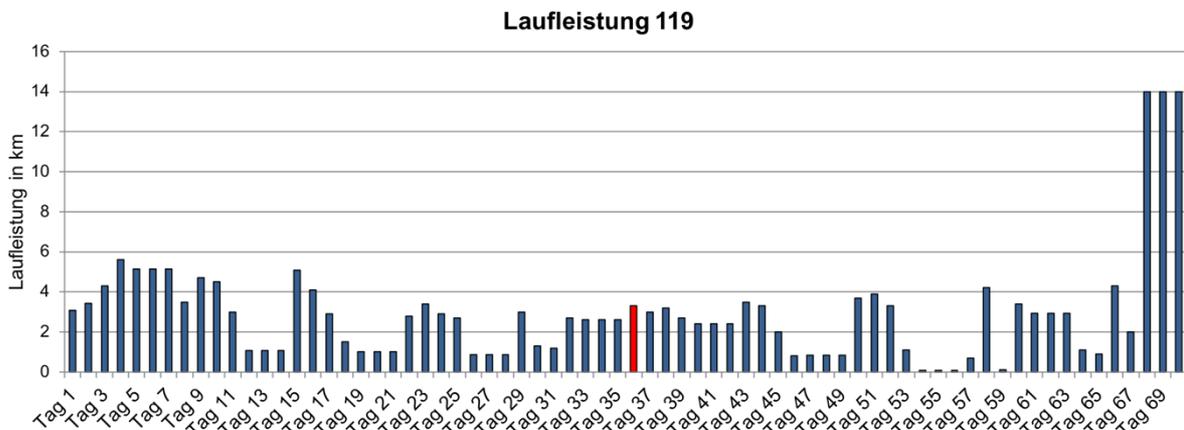
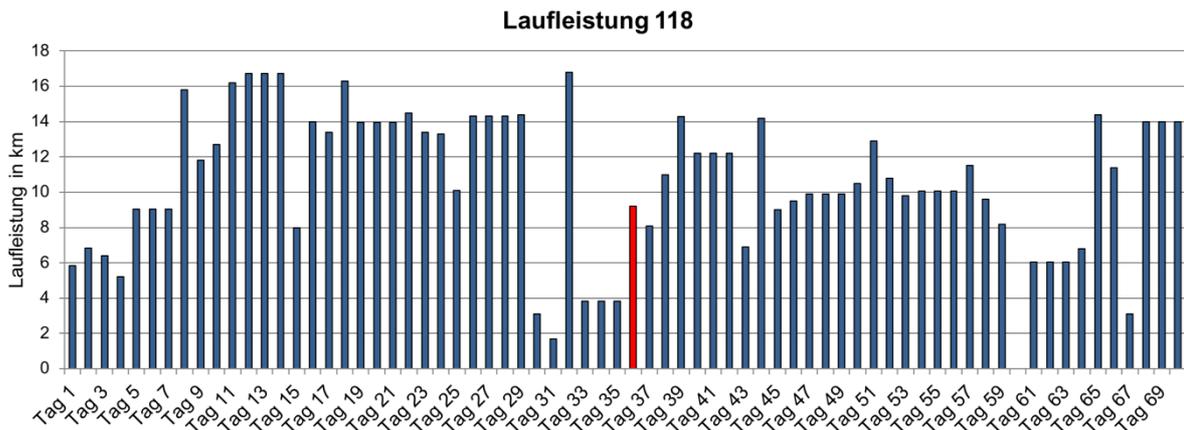
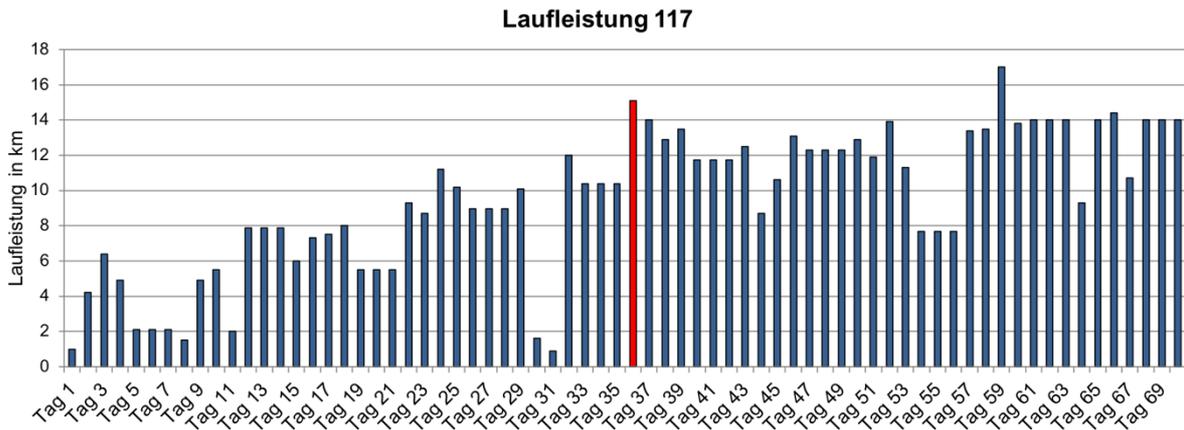


Abbildung 4-37: Schematische Darstellung der Laufleistungen

4.4.3. Einfluss eines zehnwöchigen *ad libitum*-Laufradtrainings auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene

Einfluss eines zehnwöchigen *ad libitum*-Laufradtrainings auf die Expression von Genen, die mit Inflammation, Anti-Inflammation und zellulärem Stress assoziiert sind

Il-6-r

Die *Il-6-r*-mRNA-Konzentration war in der Gruppe der Läufer im Vergleich zu den Nicht-Läufern im *M. gastrocnemius* signifikant reduziert; im *M. tibialis anterior* konnte ein entsprechender Trend beobachtet werden (Abbildung 4-38).

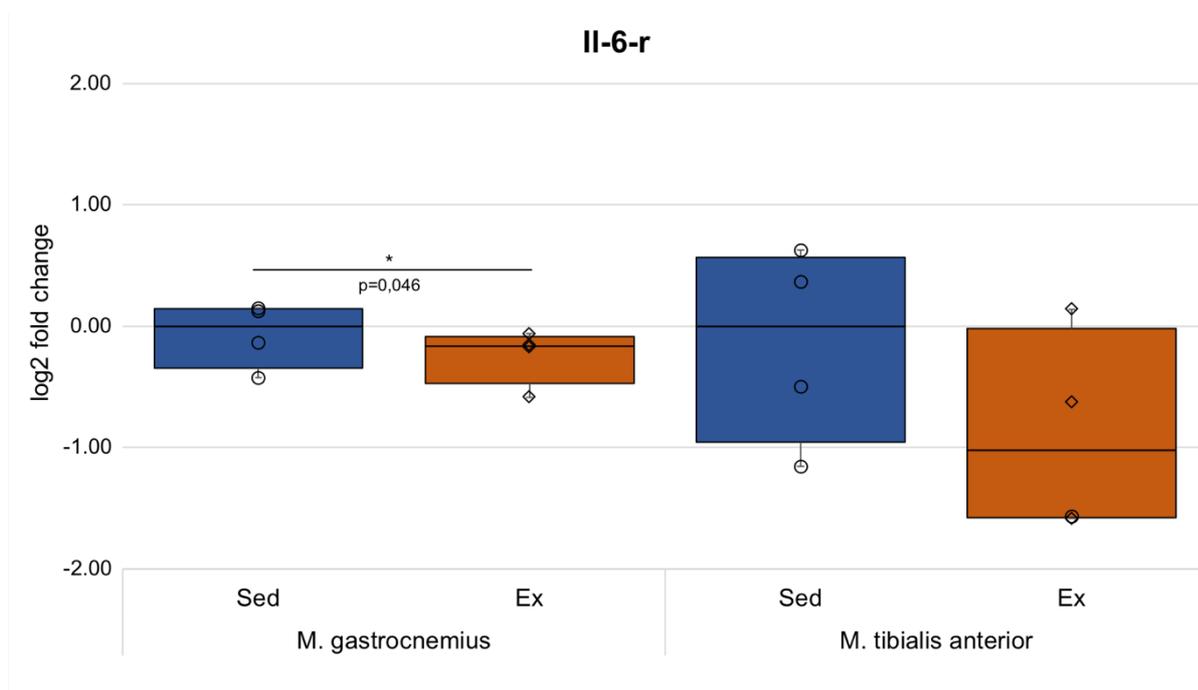


Abbildung 4-38: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens *Il-6-r* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Laufradtraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Zfp36

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen konnte weder im *M. gastrocnemius* noch im *M. tibialis anterior* eine signifikant veränderte Expression des *Zfp36*-Gens in der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nicht-Läufer auf RNA-Ebene festgestellt werden (Abbildung 4-39).

Ho1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei einem zehnwöchigen Laufradtraining keine signifikante Veränderung der Ho1-Konzentration im *M. gastrocnemius* oder im *M. tibialis anterior* in der Gruppe der Läufer beobachtet werden (Abbildung 4-39).

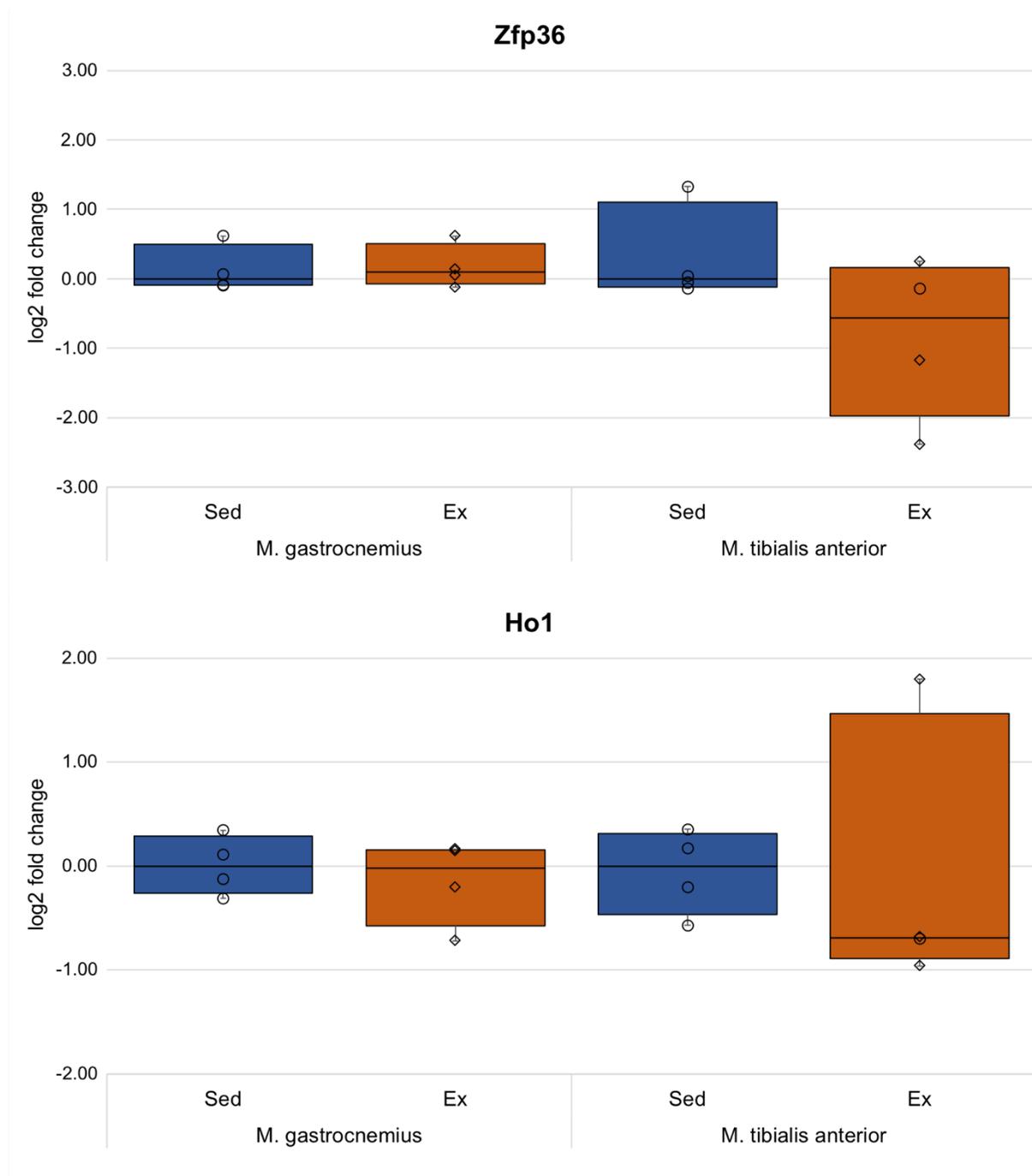


Abbildung 4-39: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene *Zfp36* und *Ho1* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Laufradtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen *ad libitum*-Lauftraining auf die Expression von Genen, die für metabolische und mitochondriale Marker kodieren

Ucp3

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Ucp3*-Gens auf RNA-Ebene bei den Läufern eine signifikante Verringerung im Vergleich zu den Nicht-Läufern aufwies. Ein entsprechender Trend konnte auch im *M. tibialis anterior* beobachtet werden (Abbildung 4-40).

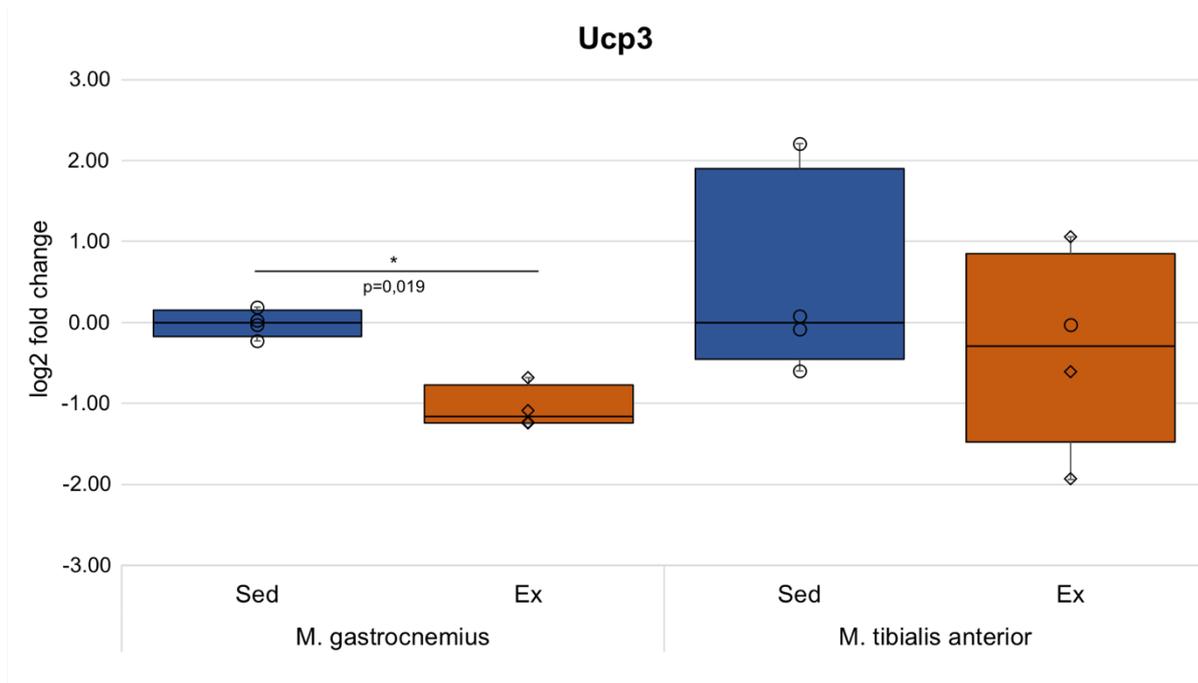


Abbildung 4-40: Analyse der Expression des mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gens *Ucp3* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als \log_2 fold change dargestellt

Cox4

Für *Cox4* konnte weder im *M. gastrocnemius* noch im *M. tibialis anterior* eine signifikante Veränderung der mRNA Konzentration für die Gruppe der Läufer im Vergleich zu den Nicht-Läufern festgestellt werden (Abbildung 4-41).

Pgc-1 α

Die Konzentration von *Pgc-1 α* -mRNA war im *M. gastrocnemius* bei der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nicht-Läufer signifikant erhöht. Ein entsprechender Trend wurde auch im *M. tibialis anterior* beobachtet (Abbildung 4-41).

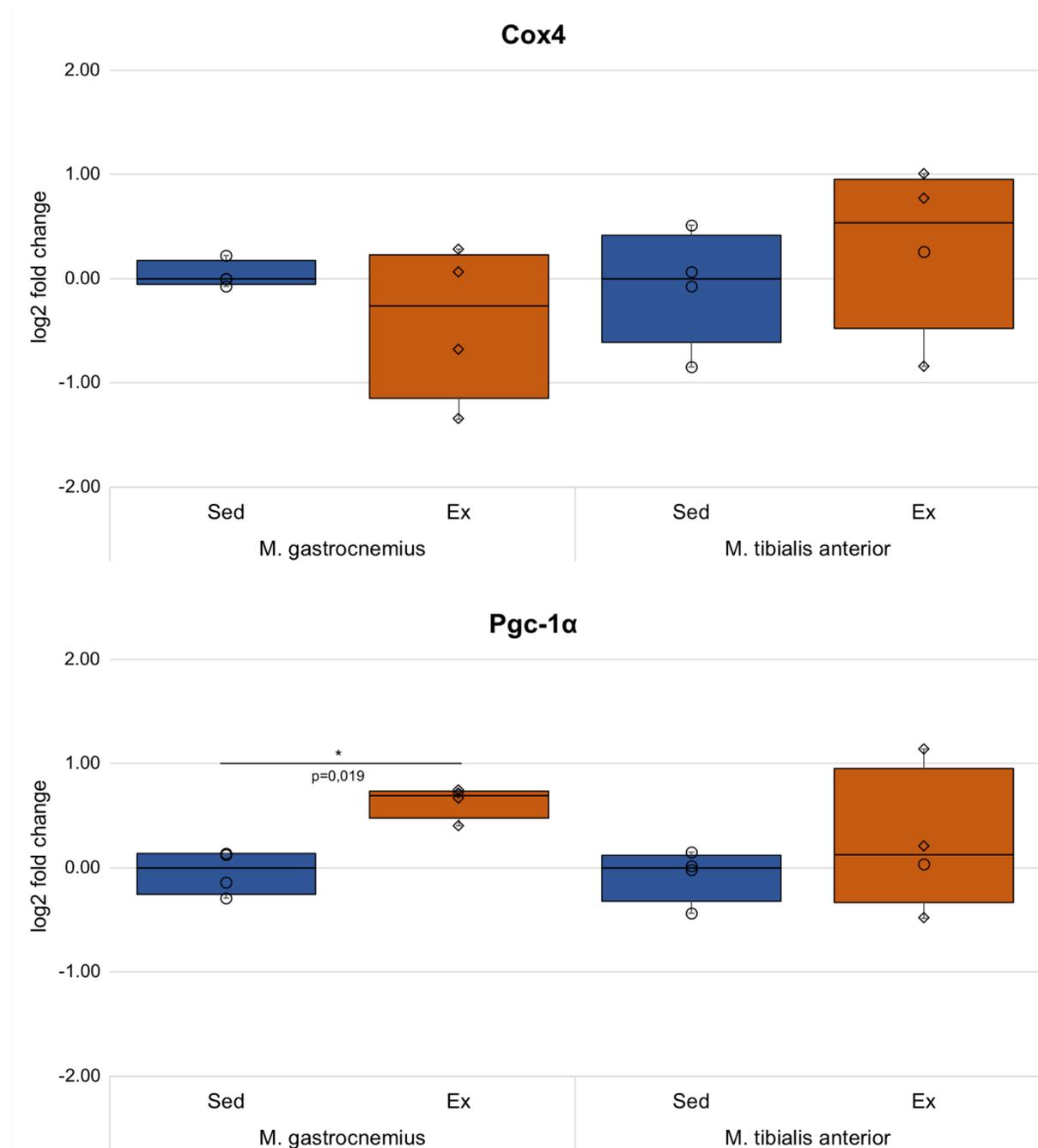


Abbildung 4-41: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene *Cox4* und *Pgc-1α* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen *ad libitum*-Lauftraining auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren

Myh1

Wie in *Abbildung 4-42* dargestellt, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf *Myh1* eine signifikant höhere Expression des entsprechenden Gens bei den Läufern im *M. gastrocnemius*. Ein derartiger Trend zeigte sich auch im *M. tibialis anterior*.

Myh2

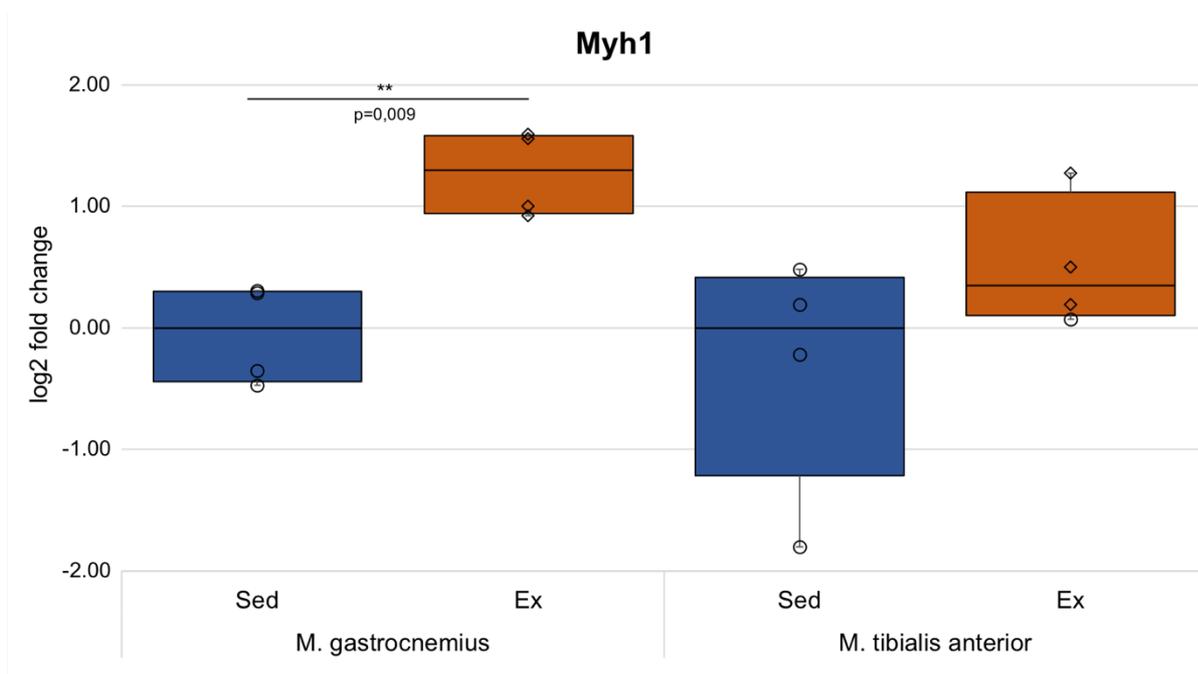


Abbildung 4-42: Analyse der Expression des für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gens *Myh1* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

Im Rahmen dieser Arbeit war eine signifikante Erhöhung des Expressionsniveaus von *Myh2* in Antwort auf Training im *M. tibialis anterior* zu erkennen, zusätzlich zeigte sich im *M. gastrocnemius* deutlich ein entsprechender Trend (*Abbildung 4-43*).

Myh7

Weder im *M. gastrocnemius* noch im *M. tibialis anterior* konnten signifikante Veränderungen in den mRNA-Konzentrationen von *Myh7* nachgewiesen werden. Dies ist in *Abbildung 4-43* dargestellt.

Actn3

Abbildung 4-44 verdeutlicht, dass sich in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf Actn3 in beiden untersuchten Muskeln ein Trend hin zu einer geringeren Expression bei den Läufern im Vergleich zu den Nicht-Läufern zeigte.

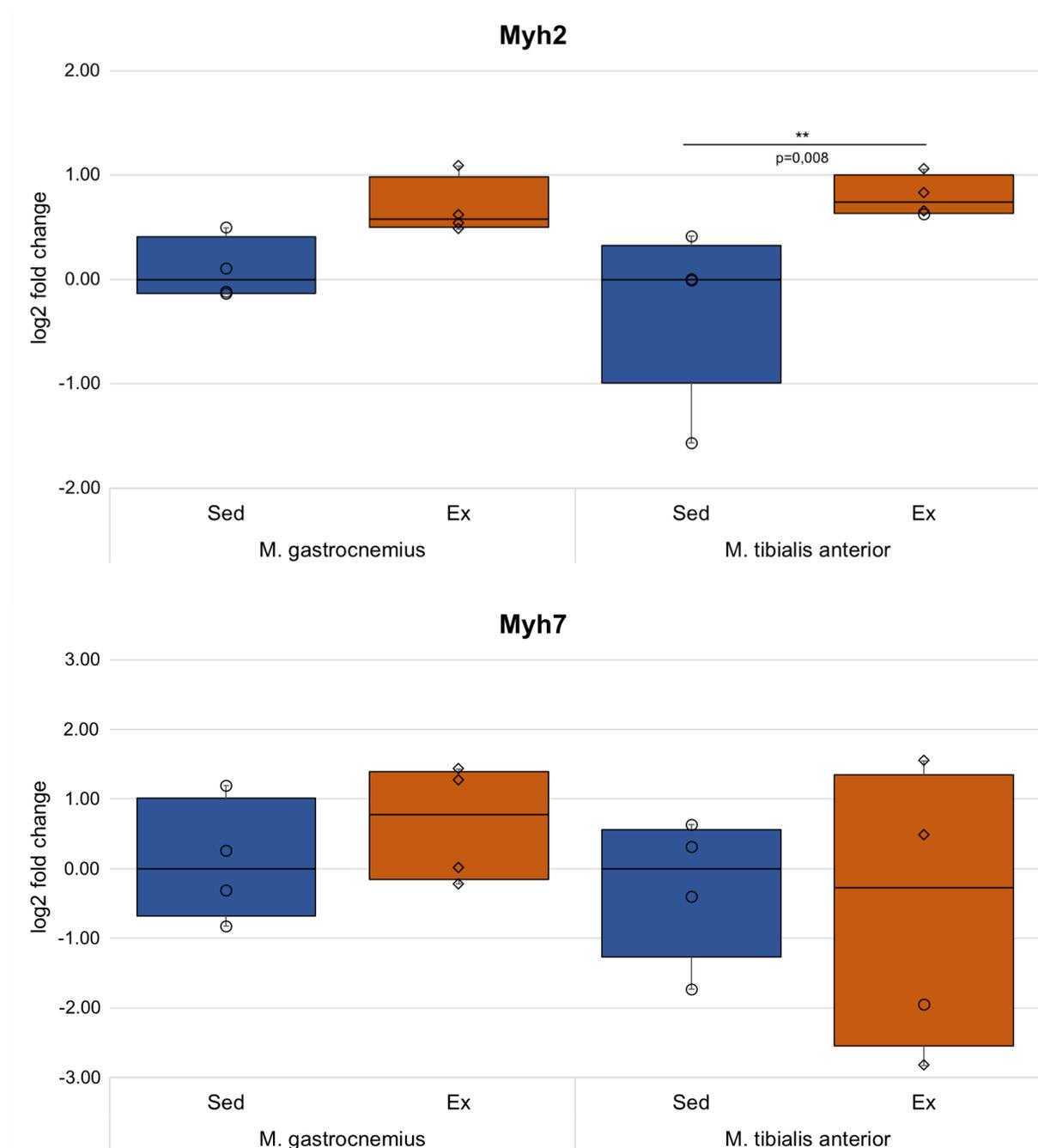


Abbildung 4-43: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene *Myh2* und *Myh7* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

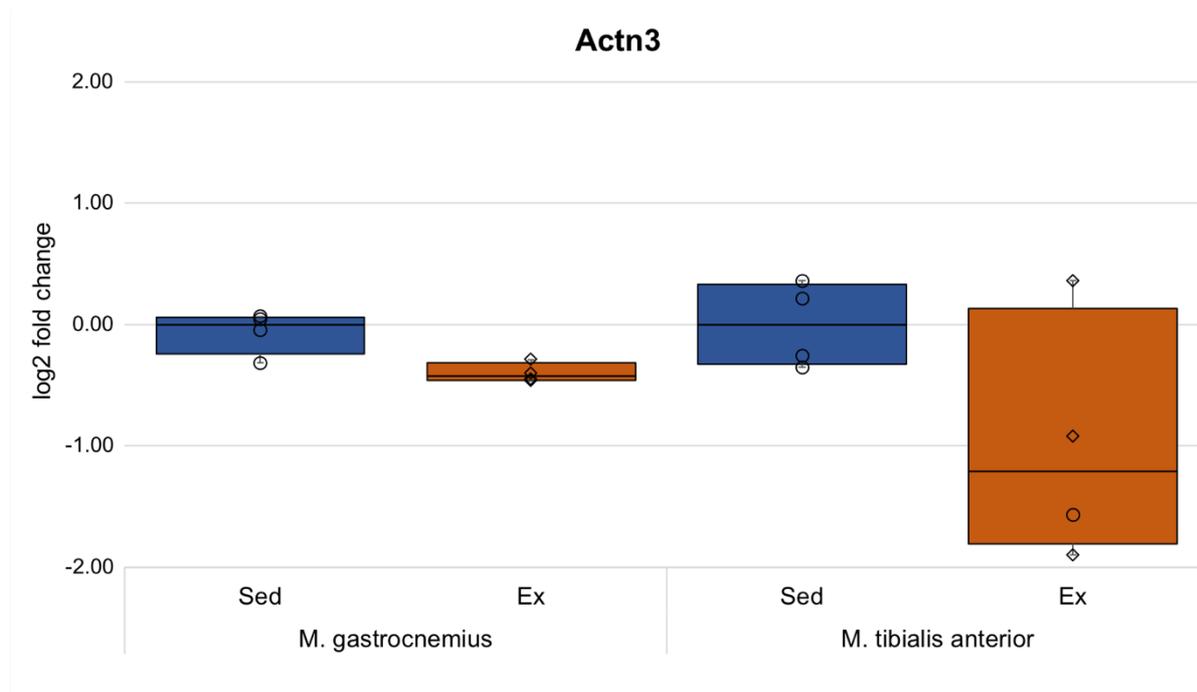


Abbildung 4-44: Analyse der Expression des für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gens *Actn3* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen *ad libitum*-Lauftrainings auf die Expression von Genen, die mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziiert sind

Mstn

Im *M. gastrocnemius* konnte in Reaktion auf das Training ein signifikant verringerter Gehalt an *Mstn*-mRNA nachgewiesen werden. Im *M. tibialis anterior* zeigte sich deutlich ein entsprechender Trend (*Abbildung 4-45*).

Murf1

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei den Mäusen, die ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining absolviert hatten, in beiden untersuchten Muskeln ein Trend hin zu einer Reduktion festgestellt werden (*Abbildung 4-45*).

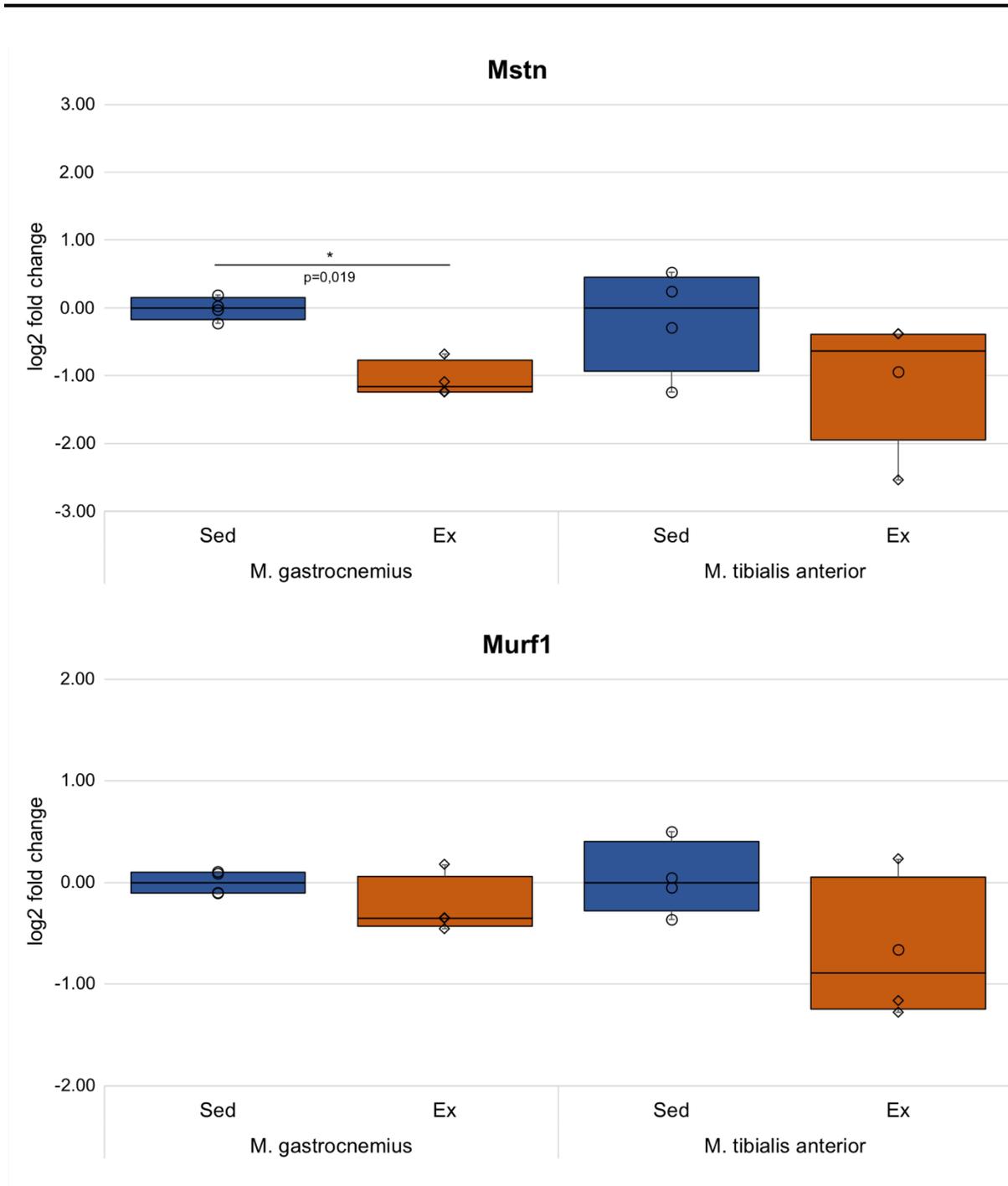


Abbildung 4-45: Analyse der Expression der mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gene *Mstn* und *Murf1* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Einfluss eines zehnwöchigen *ad libitum*-Lauftradtrainings auf die Expression von Genen, die für Faktoren kodieren, die an der miRNA-Biogenese beteiligt sind

Dgcr8, Dicer1

Weder für *Dgcr8* noch für *Dicer1* konnte eine signifikante Veränderung in den untersuchten Muskeln, *M. gastrocnemius* und *M. tibialis anterior*, festgestellt werden (Abbildung 4-46).

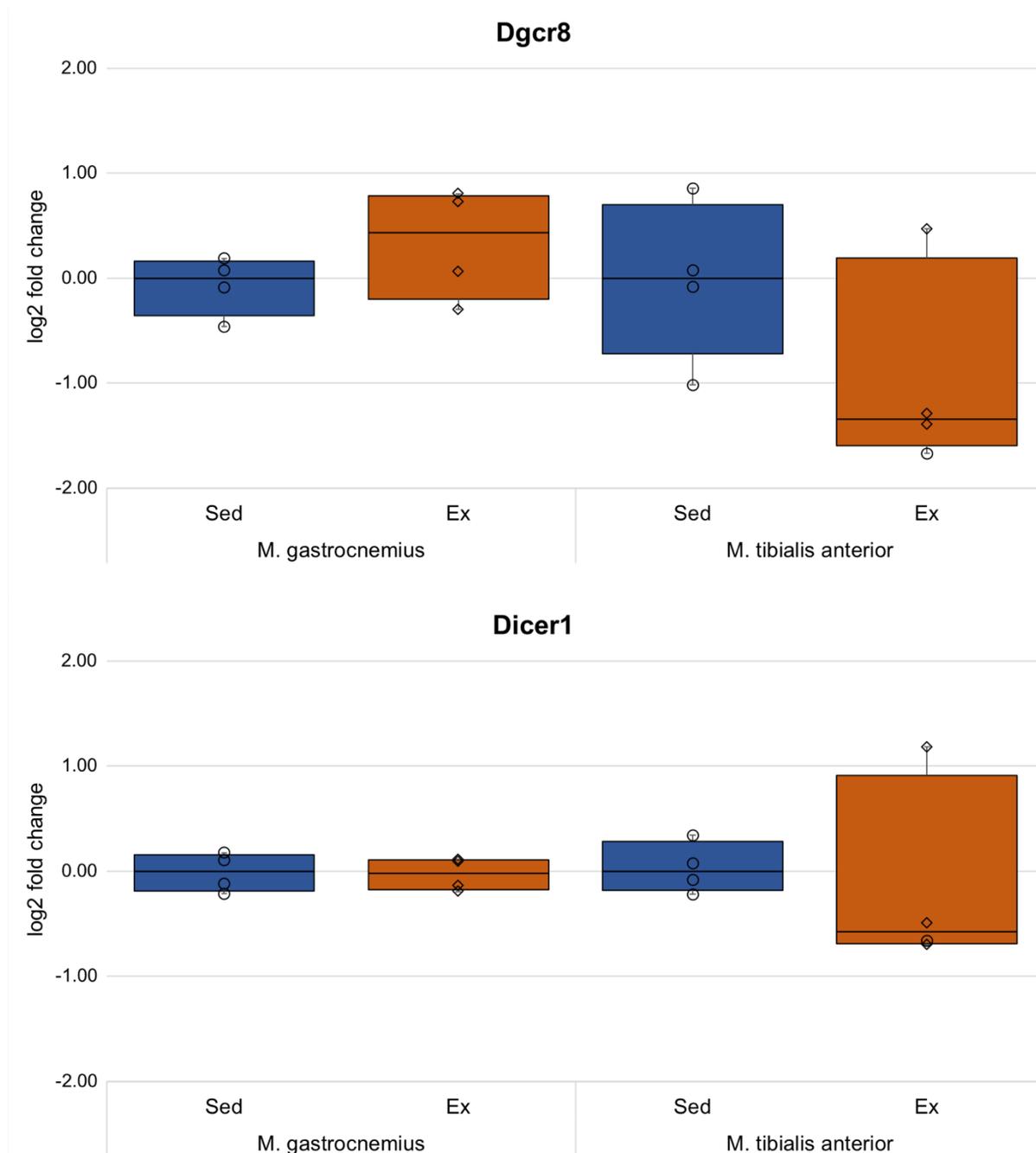


Abbildung 4-46: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Dgcr8* und *Dicer1* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftradtraining

Die Daten sind als *log2 fold change* dargestellt

Drosha

Die mRNA-Konzentration für *Drosha* zeigte im *M. tibialis anterior* einen Trend zur Repression in der Gruppe der Läufer im Vergleich zu den Nicht-Läufern (Abbildung 4-47).

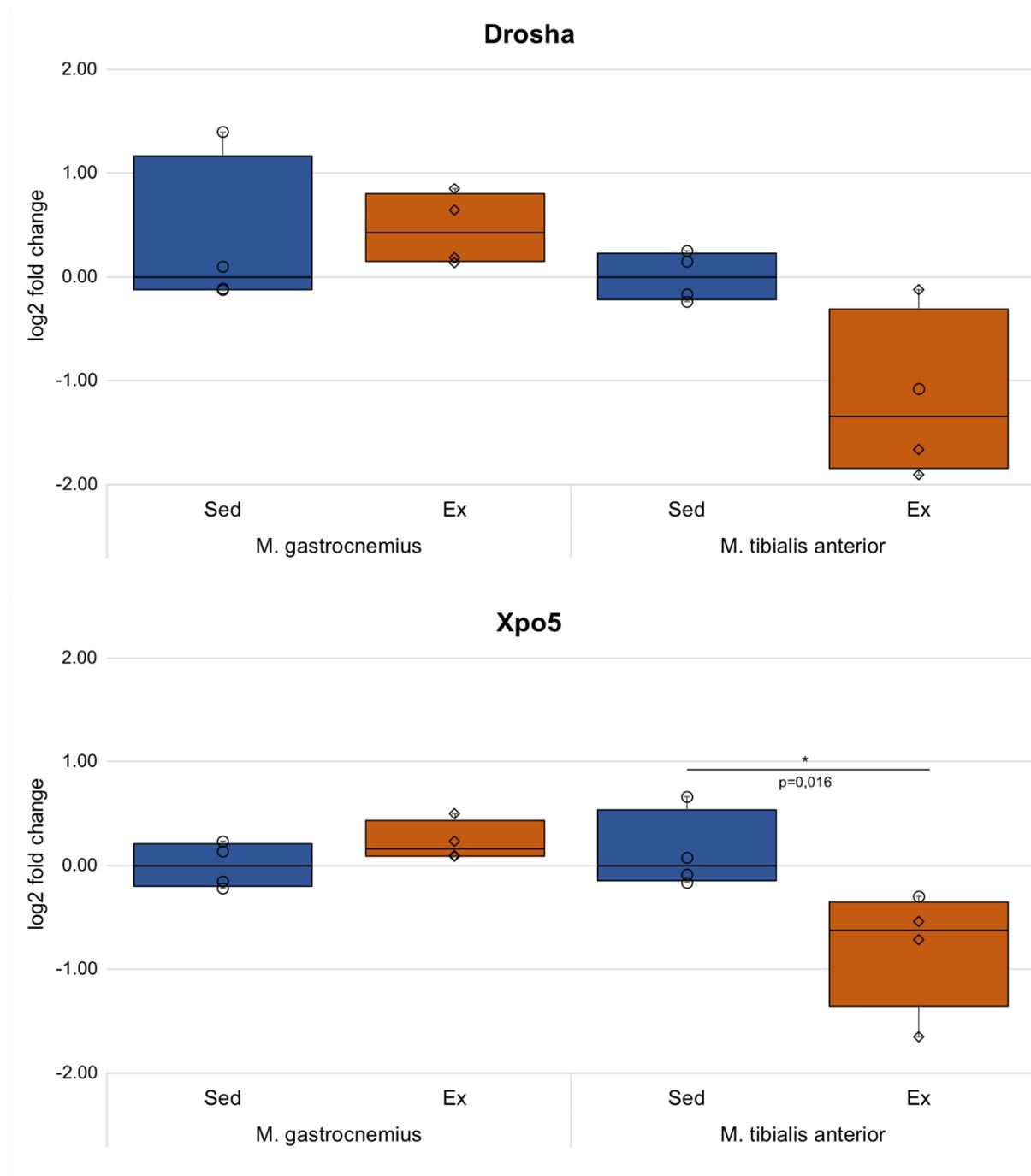


Abbildung 4-47: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Drosha* und *Xpo5* auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftradtraining

Die Daten sind als \log_2 fold change dargestellt

Xpo5

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Xpo5*-Gens im *M. tibialis anterior* bei den Tieren, die ein Training absolviert hatten, signifikant niedriger war. Für den *M. gastrocnemius* konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (*Abbildung 4-47*).

4.4.4. Einfluss eines zehnwöchigen *ad libitum*-Lauftraining auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im Skelettmuskel

miR-1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von miR-1 im *M. tibialis anterior* bei den Tieren, die ein Training absolviert hatten, höher war als bei den Nicht-Läufern. Dieses Ergebnis war signifikant und ist in *Abbildung 4-48* dargestellt. Im *M. gastrocnemius* konnte diese Veränderung nicht beobachtet werden.

miR-107

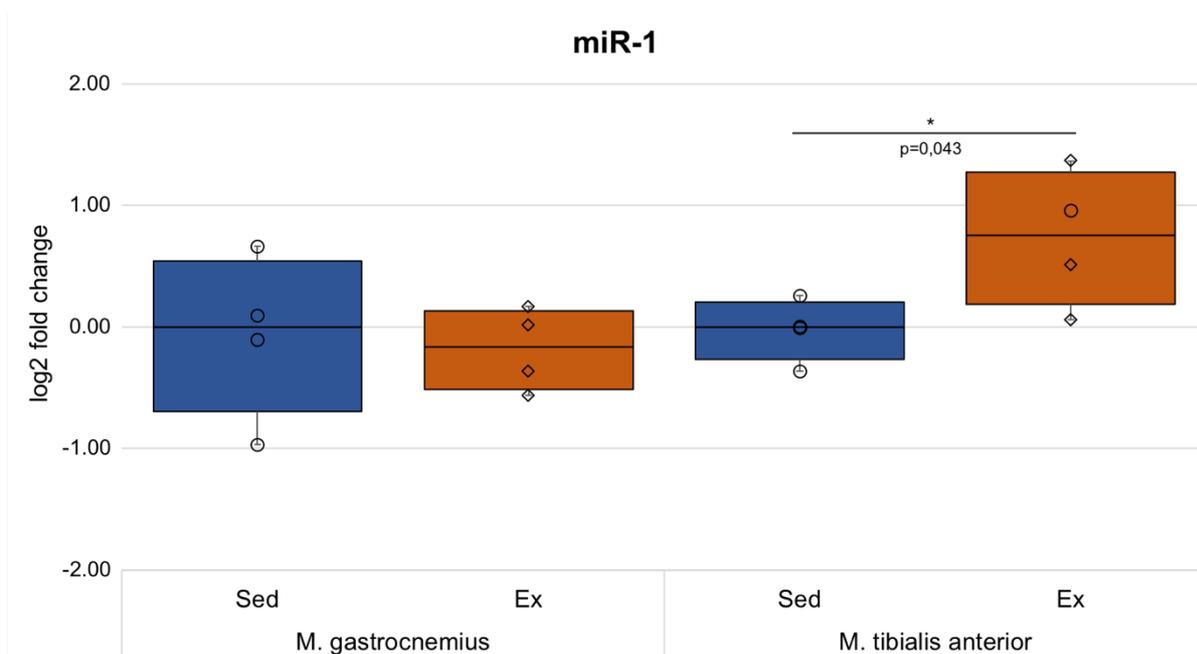


Abbildung 4-48: Analyse der Expression von miR-1 in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mäusen war die Expression von miR-107 nach Training gegenüber den Nicht-Läufern in beiden analysierten Muskeln signifikant erhöht (*Abbildung 4-52*).

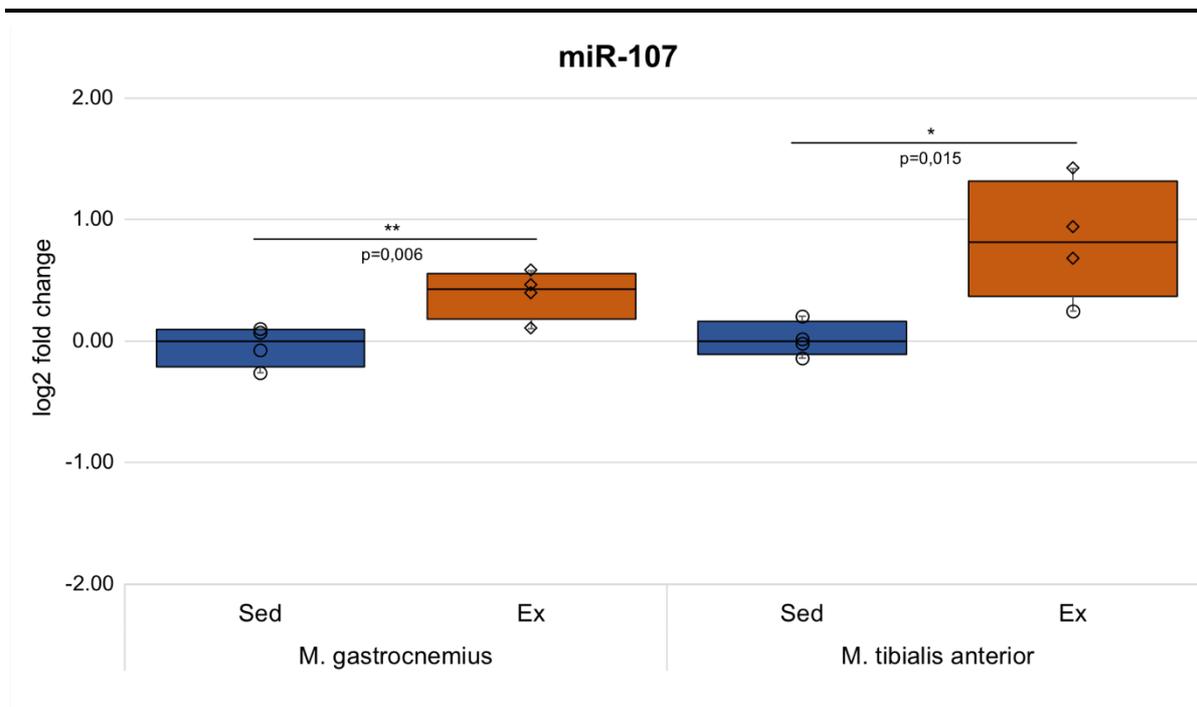


Abbildung 4-49: Analyse der Expression von miR-107 in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

miR-133a/b

Im *M. tibialis anterior* konnten sowohl für miR-133a als auch für miR-133b tendenziell erhöhte Spiegel bei den Läufern festgestellt werden. Im *M. gastrocnemius* hingegen zeigte sich für *miR-133b* dagegen eine signifikante Repression (Abbildung 4-50 und 4-51).

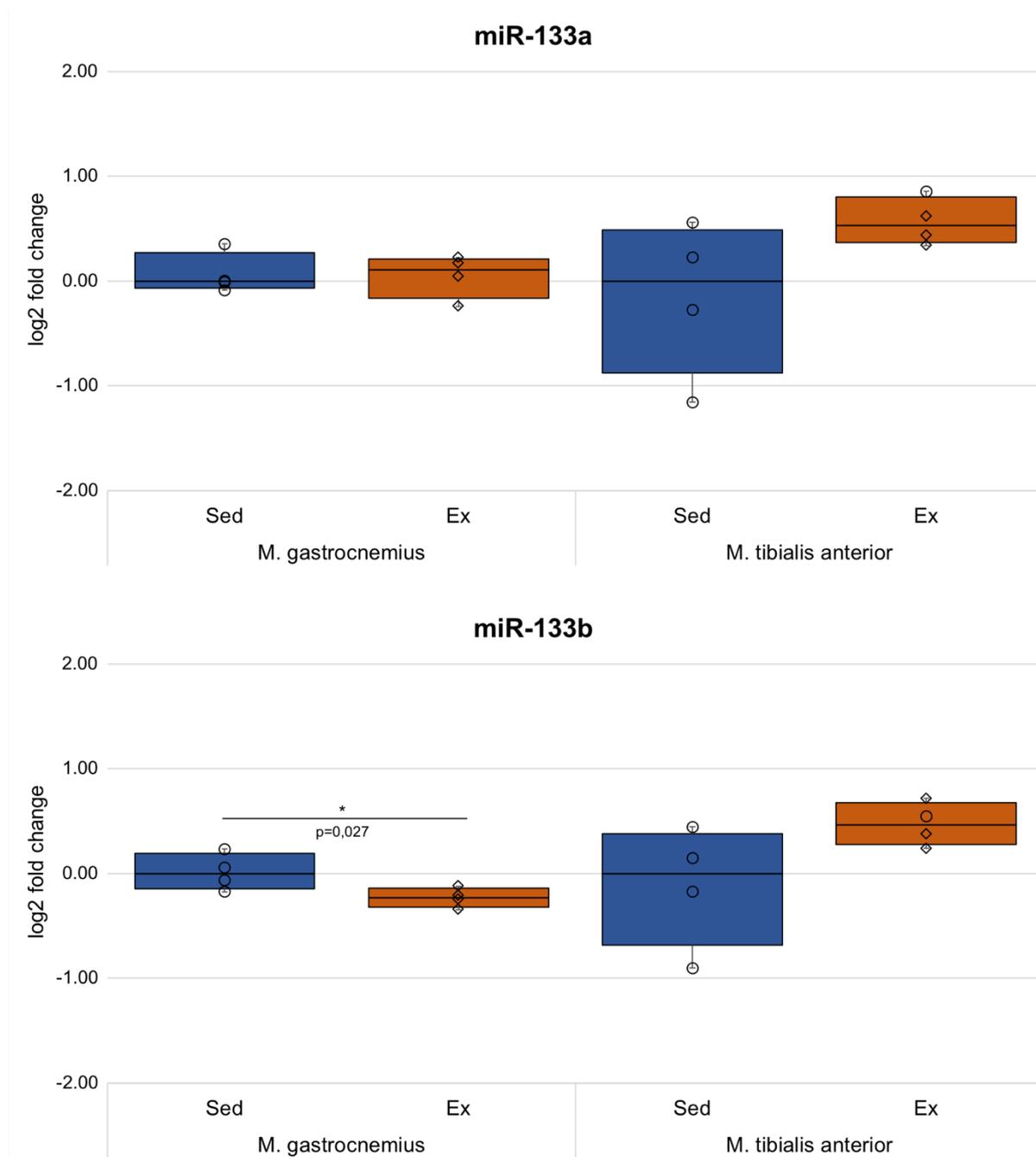


Abbildung 4-50: Analyse der Expression von *miR-133a* und *miR-133b* in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

miR-206

Wie in *Abbildung 4-52* veranschaulicht, wies die *miR-206*-Expression bei den Läufern im Vergleich zu den Nicht-Läufern keine signifikante Veränderung auf.

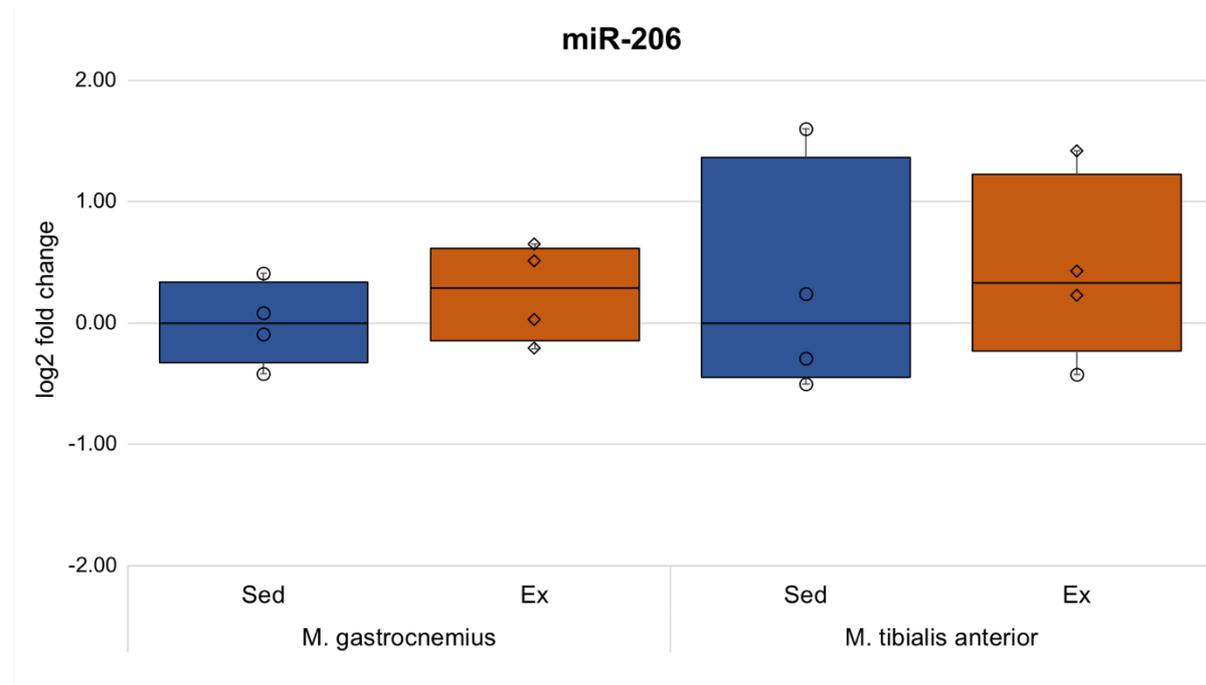


Abbildung 4-51: Analyse der Expression von miR-206 in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als *log₂ fold change* dargestellt

miR-208b

Im Rahmen dieser Studie konnten im *M. tibialis anterior* keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der miR-208b Konzentration festgestellt werden. Im *M. gastrocnemius* wiederum zeigte sich eine signifikante Repression (*Abbildung 4-53*).

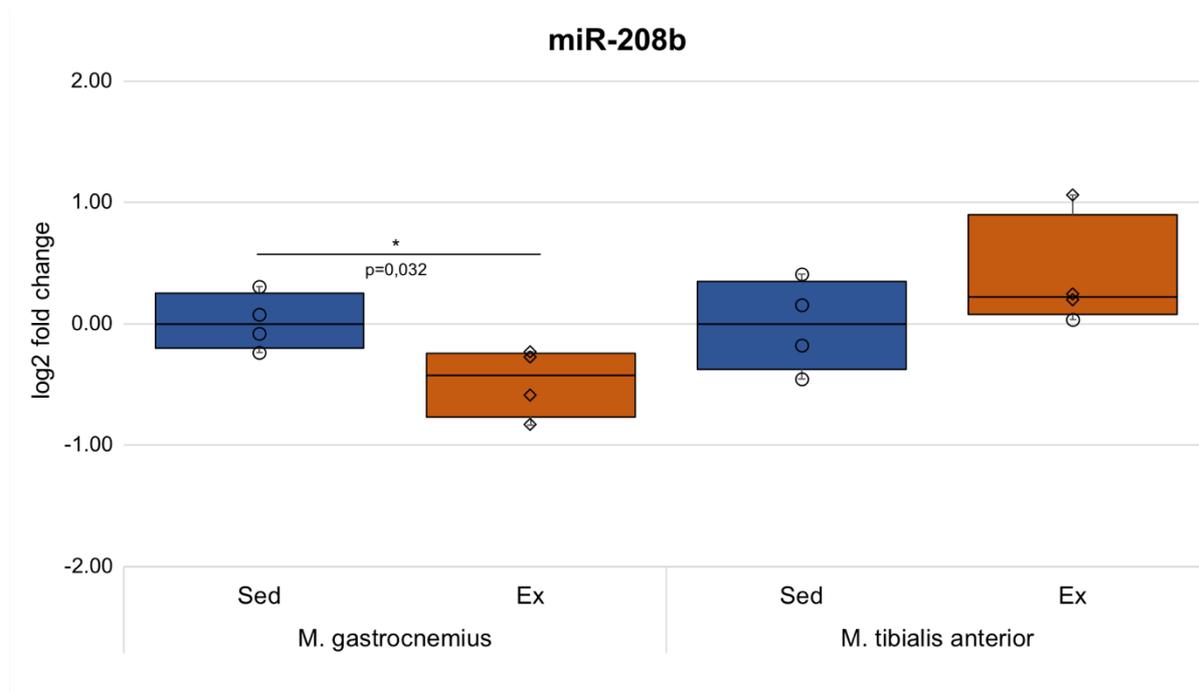


Abbildung 4-52: Analyse der Expression von miR-208b in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftradtraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

miR-20a/b

Eine signifikante Erhöhung der miR-20a- und miR-20b-Konzentrationen zeigte sich in dieser Arbeit bei den trainierten Mäusen im *M. tibialis anterior*. Wie in *Abbildung 4-54* gezeigt, konnte für den *M. gastrocnemius* dieser Effekt nicht beobachtet werden. Hier kam es bei miR-20a zu keiner signifikanten Veränderung, bei miR-20b zeigte sich hingegen eine signifikante Verringerung.

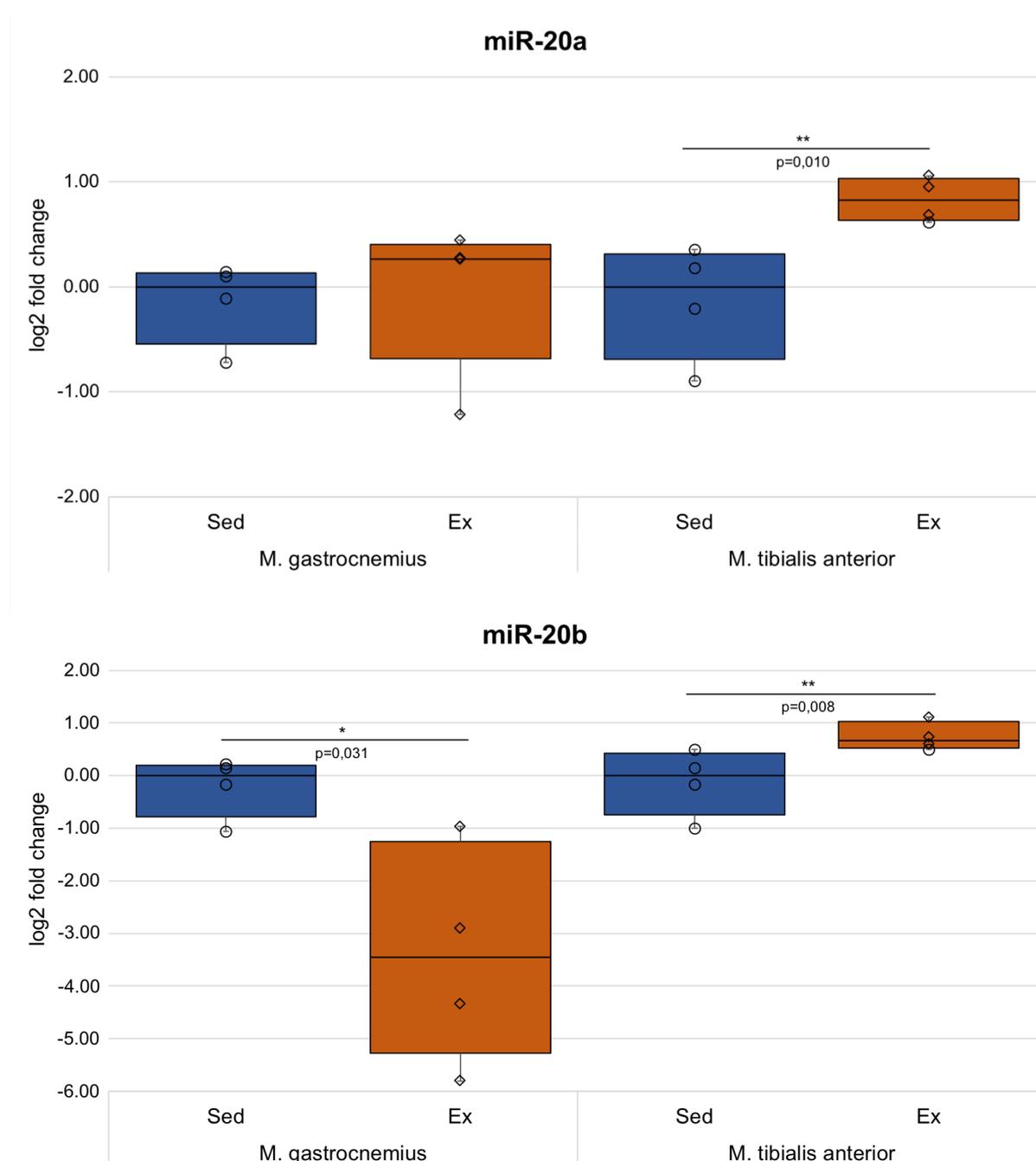


Abbildung 4-53: Analyse der Expression von miR-20a und miR-20b in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

miR-29a

Für miR-29a konnte im *M. gastrocnemius* für die Gruppe der Läufer eine signifikant niedrigere Konzentration nachgewiesen werden. Dieser Effekt war im *M. tibialis anterior* nicht festzustellen (Abbildung 4-55).

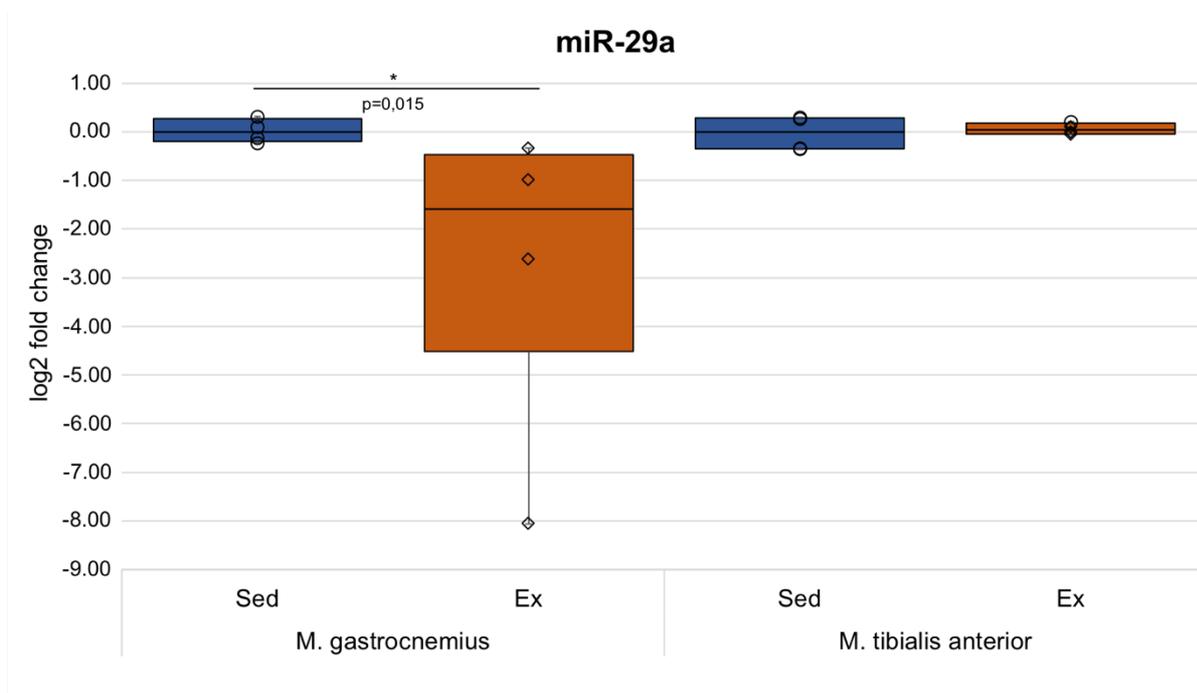


Abbildung 4-54: Analyse der Expression von miR-29a in Antwort auf ein zehnwöchiges *ad libitum*-Lauftraining

Die Daten sind als log₂ fold change dargestellt

4.5. Anpassungen des Skelettmuskels an ein zehnwöchiges Laufbandtraining und ein zehnwöchiges *ad libitum*-Laufradtraining: vergleichende Analyse

Da sowohl das Laufband- als auch das Laufrad-Experiment dieselbe Dauer hatten und die Versuchstiere bezüglich ihres Alters und Geschlechts vergleichbar waren, interessierte insbesondere der Vergleich der Effekte der beiden Trainingsformen.

Dafür wurden die Expressionslevel der verschiedenen Marker auf mRNA-Niveau, jeweils zwischen den Läufern beider Gruppen, verglichen. Die Signifikanzen beziehen sich also auf die Unterschiede Laufband zu Laufrad, nicht auf die Unterschiede zu den jeweiligen Nicht-Läufer-Kontrolltieren. Die Nulllinie stellt die Kontrolle, also die jeweiligen Nicht-Läufer, dar. Werte über Null bedeuten, dass das entsprechende Gen im Vergleich zu den Kontrollen induziert wird. Werte unterhalb von Null bedeuten, dass das entsprechende Gen im Vergleich zu den Kontrollen reprimiert wird.

Ein Wert von 1 entspricht der doppelten Menge an RNA und somit einem Induktionsfaktor von zwei. Ein Wert von -1 entspricht der halben Menge an RNA und daher einem Repressionsfaktor von zwei.

4.5.1. Einflüsse auf die Expression von Genen, die mit Inflammation, Anti-Inflammation und zellulärem Stress assoziiert sind

Il-6-r

Im *M. gastrocnemius* war die Expression des *Il-6-r*-Gens für die Gruppe der Laufband-Läufer im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, bei den Laufrad-Läufern erniedrigt. Der entsprechende Unterschied im direkten Vergleich war signifikant. Im *M. tibialis anterior* konnte ein ähnlicher Trend beobachtet werden, wobei die *Il-6-r*-Expression hier nach Laufbandtraining nicht erhöht war (Abbildung 4-56).

Zfp36

Für die Expression des *Zfp36*-Gens im *M. gastrocnemius* und *M. tibialis anterior* konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 4-56).

Ho1

Das *Ho1*-Gen wurde sowohl im *M. gastrocnemius*, als auch im *M. tibialis anterior* weder bei den Läufern der Laufrad-Gruppe, noch bei denen der Laufband-Gruppe in unterschiedlichem Maße exprimiert (Abbildung 4-56).

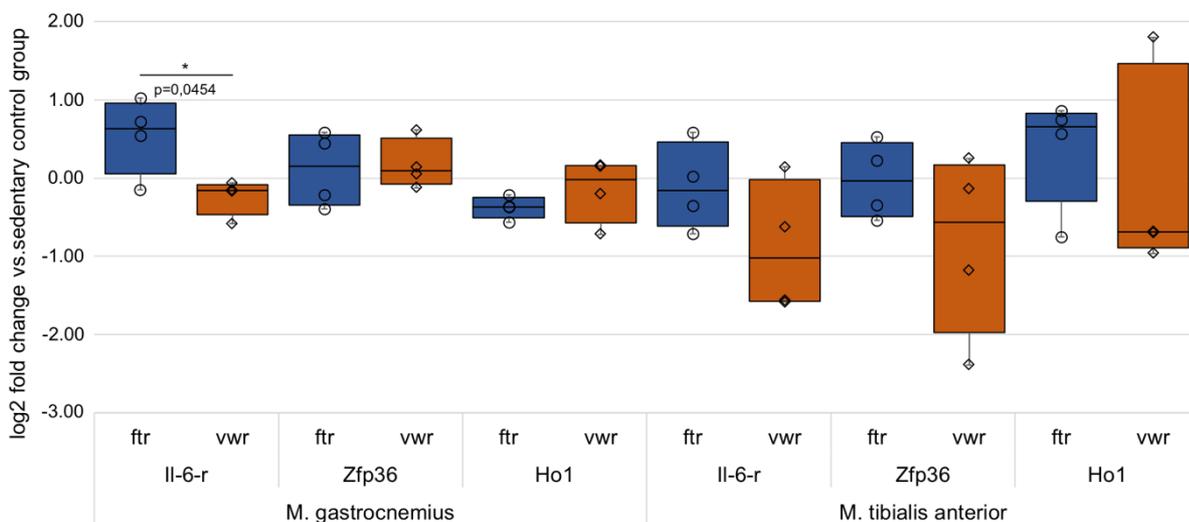


Abbildung 4-55: Analyse der Expression von entzündungsassoziierten Genen in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen *ad libitum*-Laufradtraining

Die Daten sind als *log2 fold changes* dargestellt

ftr – forced treadmill running (Laufbandtraining)

vwr – voluntary wheel running (*ad libitum*-Laufradtraining)

4.5.2. Einflüsse auf die Expression von Genen, die für metabolische und mitochondriale Marker kodieren

Ucp3 und *Cox4*

Im *M. gastrocnemius* war die Expression von *Ucp3* in Antwort auf das Laufbandtraining erniedrigt, während sie nach Laufbandtraining unverändert war. *Cox4* wurde nach Laufbandtraining unverändert exprimiert, nach Laufbandtraining vermehrt. Die entsprechenden Unterschiede im direkten Vergleich waren signifikant. Im *M. tibialis anterior* konnten weder für *Ucp3* noch für *Cox4* zwischen den Läufern der Laufband- und der Laufband-Gruppe signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 4-57).

Pgc-1 α

Die *Pgc-1 α* -Expression war im *M. gastrocnemius* in Antwort auf beide Trainingsformen erhöht, im *M. tibialis anterior* unverändert (Abbildung 4-57).

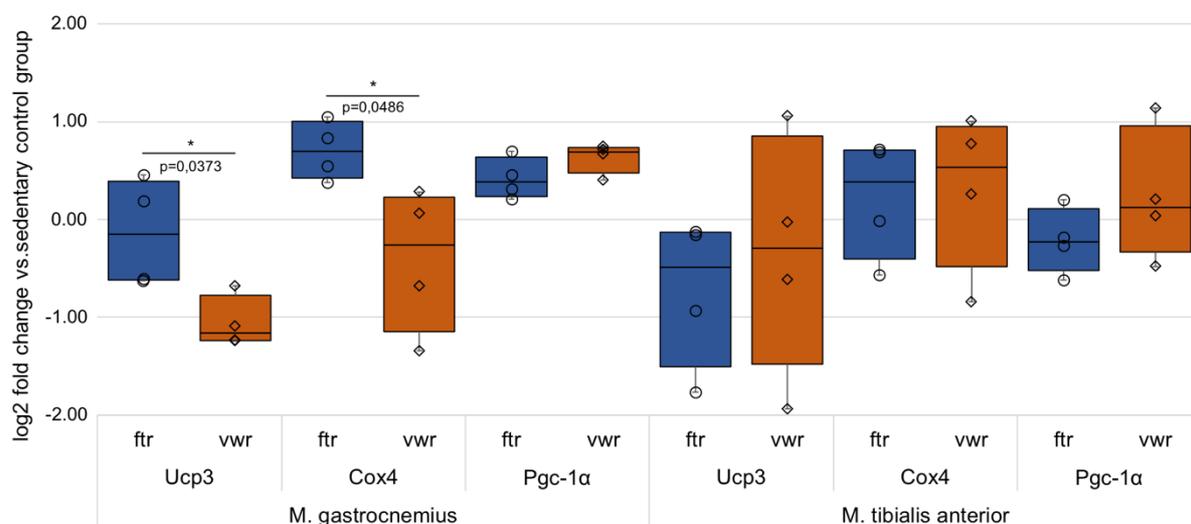


Abbildung 4-56: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen *ad libitum*-Laufbandtraining

Die Daten sind als log₂ fold changes dargestellt

ftr – forced treadmill running (Laufbandtraining)

vwr – voluntary wheel running (ad libitum-Laufbandtraining)

4.5.3. Einflüsse auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren

Myh1, Myh2, Myh7

Myh1 wies eine signifikant erhöhte Expression im *M. gastrocnemius* bei den Laufrad-Läufern auf, während sich nach Laufbandtraining keine Veränderung ergeben hatte. Der entsprechende Unterschied zwischen den beiden Trainingsformen war signifikant. Für *Myh2* und *Myh7* wurden entsprechende Trends beobachtet. Im *M. tibialis anterior* konnten für keines der untersuchten Gene, die für Myosinschwerketten kodieren, signifikante Unterschiede in Bezug auf die Effekte der beiden Trainingsformen gefunden werden (Abbildung 4-58).

Actn3

Die mRNA-Level für *Actn3* waren für die Läufer in der Gruppe des Laufradtrainings sowohl im *M. gastrocnemius*, als auch im *M. tibialis anterior* erniedrigt, allerdings war der entsprechende Unterschied zwischen den Trainingsformen nicht signifikant (Abbildung 4-58).

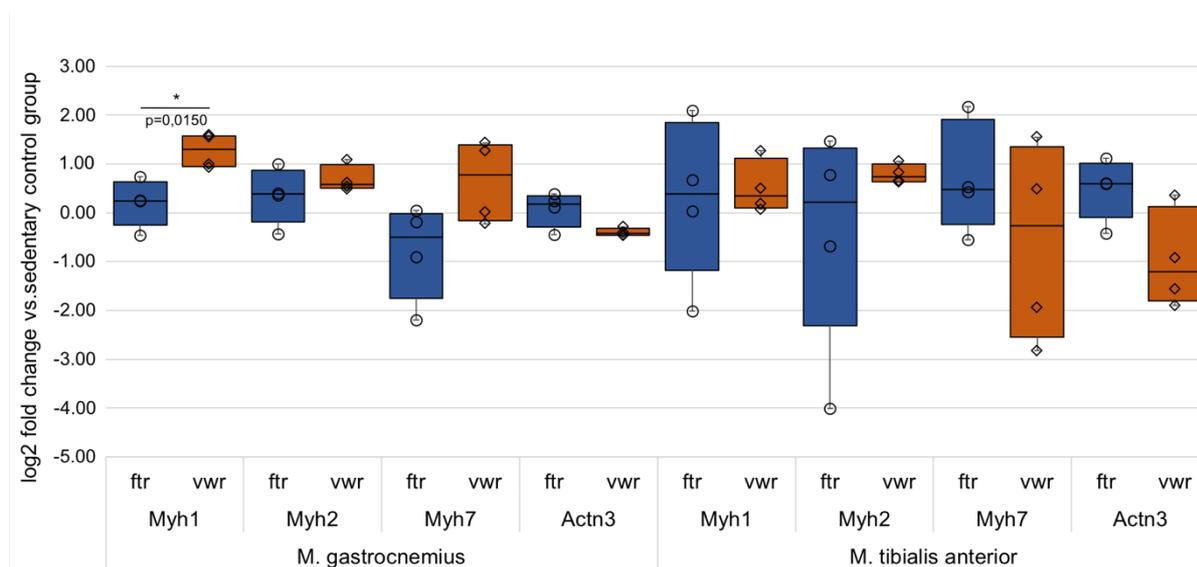


Abbildung 4-57: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen *ad libitum*-Laufradtraining

Die Daten sind als \log_2 fold changes dargestellt

ftr – forced treadmill running (Laufbandtraining)

vwr – voluntary wheel running (ad libitum-Laufradtraining)

4.5.4. Einflüsse auf die Expression von Genen, die mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziiert sind

Mstn

In beiden untersuchten Muskeln konnten für das *Mstn*-Gen in der Gruppe der Laufradläufer deutlich niedrigere Werte nachgewiesen werden, während es nach Laufbandtraining gegenläufig dazu sogar zu einer leichten Erhöhung kam. Der Unterschied zwischen den beiden Trainingsformen erreichte somit in beiden Fällen Signifikanzniveau (*Abbildung 4-59*).

Murf1

Die Expression für das *Murf1*-Gen war in beiden untersuchten Muskeln etwas reprimiert, somit war der Unterschied zwischen den Trainingsformen nicht signifikant (*Abbildung 4-59*).

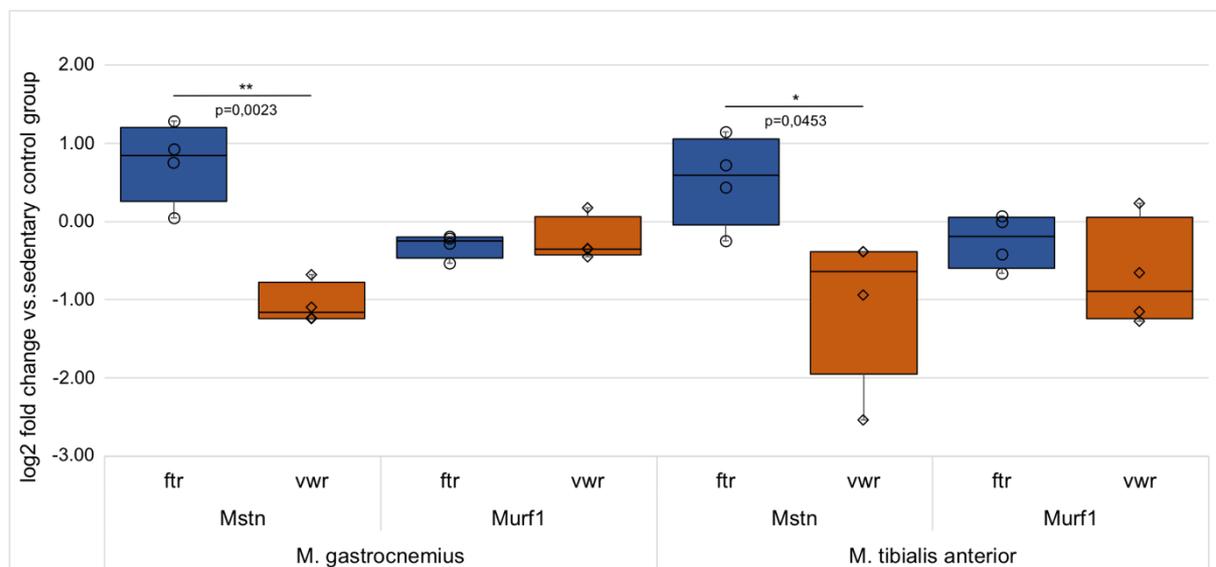


Abbildung 4-58: Analyse der Expression der mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen ad libitum-Laufradtraining

Die Daten sind als log₂ fold changes dargestellt

ftr – forced treadmill running (Laufbandtraining)

vwr – voluntary wheel running (ad libitum-Laufradtraining)

4.5.5. Einflüsse auf die Expression von Genen, die für Faktoren kodieren, die an der miRNA-Biogenese beteiligt sind

Wie aus *Abbildung 4-60* ersichtlich war nach Laufbandtraining die Expression aller vier untersuchten Gene im *M. tibialis anterior*, die für Komponenten der miRNA-Biogenese kodieren, zumindest tendenziell erhöht, nach Laufradtraining dagegen erniedrigt, was zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Trainingsformen für drei der vier untersuchten Gene führte. Dieser Effekt war im *M. gastrocnemius* nicht nachzuweisen.

4.5.6. Einflüsse auf die Konzentration verschiedener miRNA-Spezies im

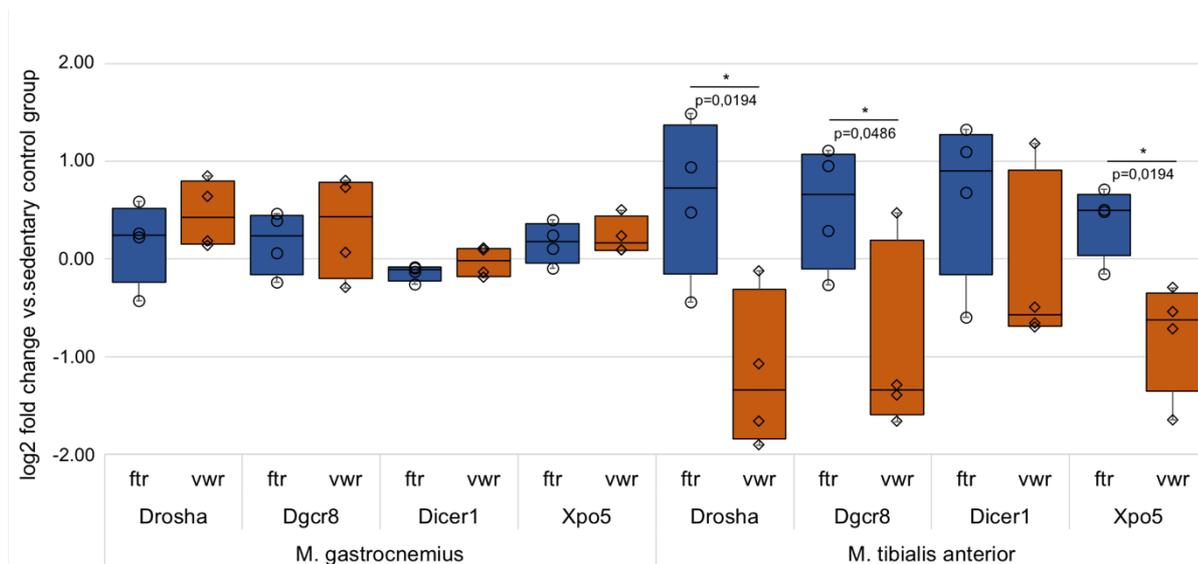


Abbildung 4-59: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen ad libitum-Laufradtraining

Die Daten sind als \log_2 fold changes dargestellt

ftr – forced treadmill running (Laufbandtraining)

vwr – voluntary wheel running (ad libitum-Laufradtraining)

Skelettmuskel

Wie in *Abbildung 4-61* gezeigt, zeigten sich für spezifische miRs spezifische Unterschiede im Vergleich zwischen den Reaktionen auf ein Laufband- und Laufradtraining. So ergab sich für miR-1 im *M. tibialis anterior* ein deutlicher Trend zur Induktion nach Laufradtraining, der nach Laufbandtraining kaum beobachtet wurde. Die Konzentration von miR-107 war im *M. gastrocnemius* etwas und im *M. tibialis anterior* tendenziell deutlich stärker nach Laufradtraining als nach Laufbandtraining erhöht. Die Konzentration von miR-20b im *M. gastrocnemius* war nach Laufradtraining deutlich erniedrigt, nach Laufbandtraining nicht – dieser Effekt war signifikant. Ein ähnlicher Trend konnte für miR-29a beobachtet werden, allerdings war dieser Befund aufgrund der großen Streuung nicht signifikant.

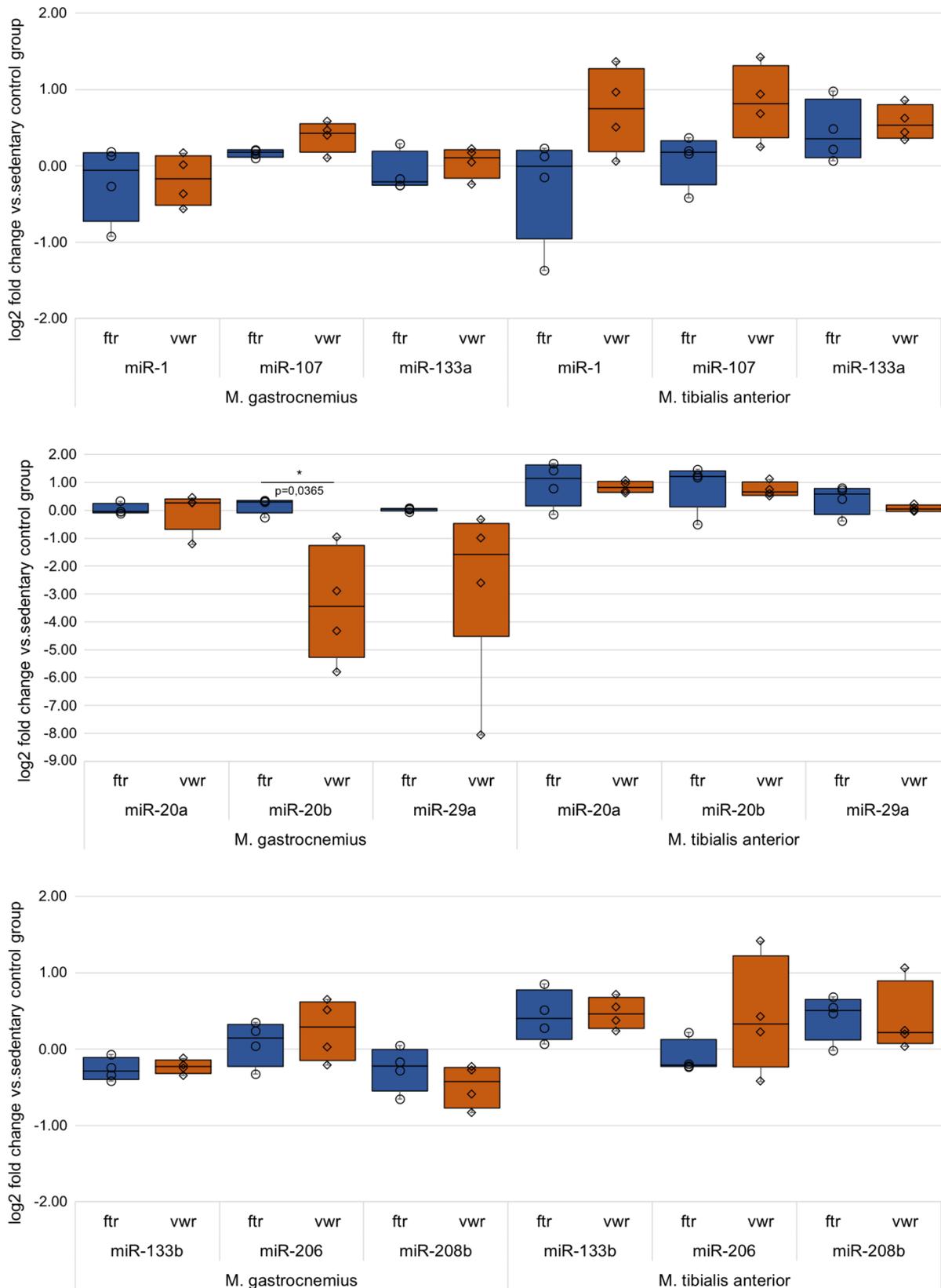


Abbildung 4-60: Analyse der Expression verschiedener *miRNA*-Spezies in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen *ad libitum*-Laufradtraining

Die Daten sind als *log₂ fold changes* dargestellt

ftr – forced treadmill running (Laufbandtraining)

vwr – voluntary wheel running (*ad libitum*-Laufradtraining)

5. Diskussion

5.1. Anpassungseffekte an eine einmalige Laufbelastung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen belastungsinduzierte Effekte auf die Genexpression. Im Folgenden sollen die wichtigsten dieser Daten im Kontext der Literatur diskutiert werden.

Im Allgemeinen steigt die Expression von *Il-6* im Skelettmuskel nach Belastung, abhängig von deren Dauer und Intensität, zumindest kurzzeitig an (Gudiksen et al., 2016; Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Bente Klarlund Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben des *M. tibialis anterior* und des *M. gastrocnemius* konnte jedoch keine Induktion der *Il-6*-Expression gezeigt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Belastung nicht intensiv und/oder lang andauernd genug war, um eine Induktion der *Il-6*-Expression nachweisen zu können. Zudem zeigt das *Il-6*-Gen insbesondere auf mRNA-Ebene eine sehr spezifische Expressionskinetik, welche durch eine schnelle Induktion und darauffolgende Repression charakterisiert ist. Auch Merle et al. (2019) konnten bei Untersuchungen an männlichen C57BL/6JJ-Mäusen nach Belastung keine erhöhte *Il-6*-Expression feststellen. Im entsprechenden Versuchsaufbau liefen die Tiere entweder 45 Minuten mit 20 cm/sec oder in den ersten 25 Minuten mit 20 cm/sec, gefolgt von einer progressiven Erhöhung der Geschwindigkeit bis zu 33,33 cm/sec in den letzten 20 Minuten. Die Tiere wurden unmittelbar nach Beendigung der Trainingseinheit getötet. Somit scheint der Untersuchungszeitpunkt nach Belastung sehr entscheidend zu sein und es ist möglich, dass der im Rahmen dieser Arbeit für die Analyse gewählte Zeitpunkt den Höhepunkt und den Abfall der *Il-6*-mRNA verfehlt haben könnte. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass eine Induktion anderer Gene, die mit Zellstress und Entzündung zusammenhängen, durchaus beobachtet werden konnte.

So stiegen die *Il-6*-r-mRNA-Spiegel erwartungsgemäß in beiden untersuchten Muskeln in Antwort auf die Belastung an. Entgegen verschiedener Literaturdaten konnte jedoch für *Cxcl-5* zumindest im *M. gastrocnemius* ein Absinken der mRNA-Spiegel festgestellt werden, was, ähnlich wie bei *Il-6*, der schnellen Induktion und kurzen Halbwertszeit des entsprechenden Transkripts geschuldet sein könnte. Für *Zfp36*, *Ho1* und *MafF* konnten ebenfalls erhöhte Expressionswerte in den untersuchten Muskeln nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stimmt mit verschiedenen Literaturdaten überein (Bakheet et al., 2001; Beiter et al., 2015; Niess et al., 1999; Popov et al., 2017).

Hinsichtlich des Stoffwechsels konnten keine erhöhten Expressionsniveaus von Genen, die für oxidative Stoffwechselregulatoren kodieren, nämlich *Nr4a3*, *Ucp3* und *Pgc-1 α* (Kawasaki et al., 2011; Kupr et al., 2017; Pattamaprapanont et al., 2016; Puigserver & Spiegelman, 2003; Scarpulla, 2008; Wende et al., 2007; Zhou et al., 2000), nachgewiesen werden. Die Expression von *Cox4* blieb dagegen, entgegen publizierter Daten (Sylviana et al., 2019) , unverändert, was wiederum einer zu geringen Belastungsintensität und/oder –dauer oder der spezifischen Expressionskinetik dieses Gens geschuldet sein könnte.

Hinsichtlich des Einflusses der Belastung auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren (*Myh1*, *Myh2*, *Myh7* und *Actn3*) konnten keine nennenswerten Effekte beobachtet werden. Vermutlich ist hier vor allem der Untersuchungszeitpunkt der Proben entscheidend.

Die Effekte auf die *Mstn*-Expression waren subtil, während für *Murf1* zumindest ein deutlicherer Trend hin zu einer verstärkten Expression nachgewiesen werden konnte. Literaturdaten legen nahe, dass *Murf1* möglicherweise Muskelumbauprozesse und die metabolische Aktivität des Muskels steuert (Foletta et al., 2011), weswegen eine belastungsgesteuerte Induktion sinnvoll erscheint.

Trotz der Tatsache, dass die meisten der beobachteten Effekte insgesamt geringgradig ausgeprägt und teilweise inkonsistent waren, legen die gewonnenen Daten somit in ihrer Gesamtheit nahe, dass das verwendete Laufprotokoll spezifische Aspekte der metabolischen und strukturellen Anpassung in der Skelettmuskulatur induziert.

Überraschenderweise konnten keine wesentlichen Auswirkungen auf die Expression von Genen, die für Faktoren kodieren, die an der miRNA-Biogenese beteiligt sind, beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Gesamtaktivität dieses Wegs in Reaktion auf die Belastung nicht signifikant verändert wurde. Zudem wurden nur für zwei der untersuchten miRNAs, nämlich miR-107 und miR-208b und auch für diese nur im *M. tibialis anterior*, Effekte der Laufeinheit gefunden, was ebenfalls dafür spricht, dass die durchgeführte Belastung nur wenig Einfluss auf das miRNA-Muster der untersuchten Muskeln hat.

Wie auch die Halbwertszeit verschiedener in dieser Arbeit untersuchten mRNAs ist auch die vieler miRNAs sehr kurzlebig (Beals et al., 1999; Greenberg, 1972; Lodish, 2000; Marzi et al., 2016; Sharova et al., 2009). Daher ist auch in diesem Fall der Untersuchungszeitpunkt nach Belastung ein entscheidender Faktor. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde in den meisten anderen Untersuchungen die Konzentration der

mRNAs und miRNAs zu mehreren Zeitpunkten nach der Trainingseinheit gemessen (Widmann et al., 2019). Vermutlich spielt auch die Trainingsintensität eine entscheidende Rolle. Das hier verwendete Laufbandprotokoll (24 cm/sec = 0,864km/h, 15° Steigung) ist als leichte bis moderate Belastung anzusehen (Cho et al., 2015; Martinez-Huenchullan et al., 2019; Wang et al., 2017). Es ist daher sehr gut möglich, dass die Belastung nicht intensiv genug war, um deutlichere Veränderungen des m- und miRNA-Musters zu bewirken. Es wäre daher ratsam, für zukünftige Versuchsaufbauten, vorzugsweise zu mehreren Zeitpunkten Proben zu nehmen und intensivere Trainingsprogramme zu nutzen.

Wie den Ergebnissen weiterhin zu entnehmen ist, konnten zum Teil abweichende Effekte in den beiden untersuchten Muskeln beobachtet werden. Dies könnte zum einen mit ihrer unterschiedlichen Fasertypzusammensetzung, zum anderen aber auch mit einer unterschiedlichen Belastung beim Laufen auf einer Steigung zusammenhängen.

Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass die beschriebenen Ergebnisse vor allem durch die kleine Stichprobengröße und die kleine Anzahl der analysierten Gene im Sinne einer Pilotstudie als vorläufig zu betrachten sind und ihre Aussagekraft daher limitiert ist.

5.2. Anpassungseffekte an ein zehnwöchiges Lauftraining

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten legen nahe, dass sowohl ein zehnwöchiges, regelmäßiges Laufbandtraining, als auch ein zehnwöchiges, regelmäßiges *ad libitum*-Laufradtraining Auswirkungen auf die Genexpressionsmuster der Skelettmuskulatur hatten. Während einige Effekte ähnlich waren, unterschieden sich andere deutlich zwischen den beiden Trainingsarten. Die Daten deuten darauf hin, dass die beiden Trainingsprogramme gemeinsame, aber auch unterschiedliche Auswirkungen auf das Skelettmuskelgewebe der Hintergliedmaßen haben.

Ein Ansatz für eine Erklärung könnte sein, dass die zurückgelegten Laufstrecken, also die insgesamt gelaufenen km, deutliche Unterschiede zeigten. Wöchentlich legten die Tiere der Laufband-Gruppe im Rahmen des Trainings eine Strecke von rund 2,4 km zurück, während jene Tiere, deren Käfig mit einem Laufrad ausgestattet war, eine durchschnittliche Laufstrecke von ca. 55 km absolvierten. Die in dieser Studie verwendeten Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6J zeigten auch in anderen Studien ein ähnliches Laufverhalten (Allen et al., 2001; Bartling et al., 2017; Konhilas et al., 2004; LaBarge et al., 2016; Lightfoot et al., 2004; Manzanares et al., 2018), was für ein artgerechtes Verhalten unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten

Versuchsbedingungen spricht. Da man somit annehmen kann, dass die aus der erbrachten Leistung resultierenden Energiebedürfnisse der Tiere ebenfalls stark unterschiedlich waren, ist es wahrscheinlich, dass auch der Nahrungsverbrauch und die damit aufgenommene Energiemenge in der Laufrad-Gruppe höher war. Dies könnte ebenfalls die Ergebnisse beeinflusst haben. Diese Annahme wird durch neueste Ergebnisse einer vergleichbaren Studie, bei der ebenfalls Effekte von Laufband- und Laufradtraining verglichen wurden (Y. J. Kim et al., 2020), untermauert. Die Autoren konnten eine erhöhte Nahrungsaufnahme in der Laufrad-Gruppe verzeichnen. In diesem Zusammenhang ist jedoch die Tatsache interessant, dass in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichts zwischen den Tieren der Kontroll-Gruppe und den Tieren der Laufrad-Gruppe festgestellt werden konnte, wohingegen Kim et al. eine geringere Gewichtszunahme bei körperlicher Betätigung aufzeigen konnten. Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Umstand könnten die verwendeten, unterschiedlichen Trainingsprotokolle sein.

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere, die ein Laufbandtraining absolvierten, wurden von den Betreuern während des Trainings dazu animiert, mit dem moderaten Tempo des Laufbands Schritt zu halten. Die Tiere der Laufrad-Gruppe hingegen konnten zu jeder Zeit frei entscheiden, das Laufrad in einem selbstgewählten Tempo zu nutzen. Wenngleich im Rahmen dieser Arbeit die Laufgeschwindigkeiten im Laufrad nicht dokumentiert wurden, so war der Eindruck der Experimentatoren, dass die Tiere vor allem kürzere, schnellere Intervalle, ähnlich einem HII-Training („High Intensity Interval Training“, hochintensives Intervalltraining), zu absolvieren schienen, was auch schon von anderen Autoren beschrieben wurde (Manzanares et al., 2018) und im Gegensatz zum eher moderat-kontinuierlichen Laufen auf dem Laufband steht. Dieses Laufverhalten, welches eher einem Sprint- als einem Ausdauertraining ähnelt, kommt den natürlichen Aktivitätsmustern von Nagetieren nahe, was auch anhand entsprechender Untersuchungen an Wildtieren dokumentiert wurde (Meijer & Robbers, 2014).

Einschränkend sei jedoch zu erwähnen, dass unser Versuchsaufbau keine Überwachung der spontanen Aktivität abseits des Laufrades oder Laufbandes zuließ.

Ein limitierender Faktor in Bezug auf die Laufleistung der Tiere der Laufrad-Gruppe schien die Position der Käfige im Käfiggestell zu sein. Um Überschneidungen der Funkübertragung zwischen den jeweiligen Tachometern und Empfängern zu vermeiden, wurden die Käfige an den Ecken des Käfiggestells positioniert. Dabei entstand der Eindruck, dass jene Tiere, die in den unteren Regalfächern positioniert wurden, mehr km

zurücklegten als die Tiere in den oberen Regalfächern. Dies war auch der Grund für den Entschluss, die Käfigpositionen in der Mitte der Trainingsperiode zu tauschen, wobei die danach gemessenen Laufleistungen den ersten Eindruck zumindest zum Teil bestätigten. Da keine Aufzeichnungen darüber erstellt wurden, zu welchen Zeiten und wie lange die Tiere das Laufrad nutzten, können hier nur Vermutungen in Bezug auf eine Erklärung angestellt werden. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Mäuse vor allem während der Dunkelphase laufen und aktiv sind. Da somit vermutlich auch in diesem Versuch der größte Teil der Laufaktivität in der Dunkelphase stattfand, könnte es sich bei den unterschiedlichen Laufleistungen um eine indirekte Auswirkung der Käfigposition handeln: Die Tiere in den unteren Fächern könnten während der Lichtphase mehr Ruhe gehabt haben und somit während der Dunkelphase erholt gewesen sein. Da das freiwillige Laufen in einem Laufrad, vermutlich aufgrund der Tatsache, dass es in Teilen eher einem HII-Training und nicht einem reinen Ausdauertraining entspricht, durchaus auch muskelanabole Effekte haben kann (Garvey et al., 2015; Manzanares et al., 2018), ergab sich die Frage, ob ein solcher Effekt auch an den hier untersuchten Tieren messbar sein würde, wenngleich die Gesamt-Gewichtszunahme der Laufrad-Gruppe nicht signifikant höher war als die der Kontrollgruppe. In der Tat konnte ein Trend zu einem höheren Muskelgewicht bei den Läufern festgestellt werden. Dieser Trend war im *M. tibialis anterior* stärker als im *M. gastrocnemius* nachweisbar. Diese Beobachtung deckt sich auch mit jüngsten Ergebnissen anderer Autoren (Y. J. Kim et al., 2020) und spricht in der Tat für einen muskelanabolen, hypertrophieinduzierenden Effekt des *ad libitum*-Laufradtrainings.

Die unterschiedlichen Belastungen, die die verschiedenen Muskeln während des Laufens erfahren, könnten dabei unterschiedliche Grade von Hypertrophie in den einzelnen Muskeln widerspiegeln. Die beobachtete Hypertrophie könnte aber ebenso auf intrinsische Eigenschaften der jeweiligen Muskeln zurückzuführen sein, wie z.B. regulatorische Muster der Signaltransduktion und unterschiedliche Formen der transkriptionellen Regulation. Diese beiden Faktoren könnten die im Rahmen dieser Arbeit in diversen Kontexten gemachte Beobachtung erklären, dass die Effekte des Trainings auf die Genexpressionsmuster stark vom analysierten Muskel abhängig waren. So führte im *M. gastrocnemius* das Laufbandtraining beispielsweise zu einer Induktion des *Il-6-r*-Gens, während im *M. tibialis anterior* ein solcher Effekt nicht beobachtet werden konnte. Für die Tiere, die ein Laufradtraining absolviert hatten konnten reprimierende Effekte auf die *Il-6-r*-Expression beobachtet werden. Somit konnte auch im direkten

Vergleich von Laufband- zu Laufradtraining im *M. gastrocnemius* eine signifikant niedrigere Konzentration von Il-6-r-mRNA bei den Tieren der Laufrad-Gruppe nachgewiesen werden. Andere Autoren konnten ähnliche Effekte beim Menschen beobachten (Keller et al., 2005), wobei nachgewiesen werden konnte, dass in einem trainierten Muskel die Basallevel von Il-6-r-mRNA geringer waren.

Bei keinem der beiden Trainingsprotokolle konnten veränderte Expressionsmuster für *Zfp36* oder *Ho1* beobachtet werden. Dies erscheint vor allem im Zusammenhang mit der Trainingsdauer plausibel. Beide Gene sind vor allem für die akute Entzündungsreaktion unter körperlicher Belastung relevant (Bakheet et al., 2001; Beiter et al., 2015; Vesely et al., 1998). Zudem konnte beim Menschen sogar eine Repression der Basalexpression bei trainierten Probanden beobachtet werden, was als ein Anpassungsmechanismus an regelmäßiges körperliches Training gesehen wird (Niess et al., 1999).

Des Weiteren konnten vor allem Effekte beider Trainingsprotokolle auf metabolische und mitochondriale Marker gefunden werden.

Insbesondere zeigten sich eine deutliche Induktion des *Pgc-1 α* -Gens, sowohl für die Laufband-, als auch die Laufrad-Gruppe, und des *Cox4*-Gens durch das Laufbandtraining.

Pgc-1 α ist im Zusammenhang mit Ausdauertraining an der Regulation von Anpassungsreaktionen im Skelettmuskel beteiligt (Lira et al., 2010; Puigserver & Spiegelman, 2003; Scarpulla, 2008; Wende et al., 2007). Besonders hinsichtlich einer Fasertyp-Transformation und anderen metabolischen Veränderungen der Skelettmuskulatur ist *Pgc-1 α* äußerst interessant (Chinsomboon et al., 2009; Goodpaster et al., 2003; Schiaffino et al., 2007). In diesem Zusammenhang erscheint eine erhöhte Expression des entsprechenden Gens plausibel. Auch *Cox4* ist maßgeblich an metabolischen Anpassungsreaktionen im Skelettmuskel beteiligt, wobei eine Induktion des entsprechenden Gens jedoch vor allem unmittelbar nach einer Belastung beschrieben wurde (Lira et al., 2010; Sylviana et al., 2019), was der Grund dafür sein könnte, dass ein solcher Effekt im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet wurde.

Betrachtet man die Expressionsdaten der Gene, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren, so ergaben sich deutliche Effekte. Alle Gene, die für Myosinschwerketten kodieren, zeigten, zum Teil deutlich signifikant, höhere Expressionsniveaus in der Gruppe des Laufradtrainings. In Anbetracht einer möglicherweise insgesamt anabolen Situation, kann so auch das erhöhte Muskelgewicht bzw. die beobachtete Muskelhypertrophie in dieser Gruppe erklärt werden. Konsistent konnten auch signifikant erniedrigte *Mstn*-

Expressionswerte nachgewiesen werden. Auch zeigten sich Tendenzen zu einer verminderten Expression des *Murf1*-Gens in allen Muskeln. Diese Effekte beschränkten sich allerdings auf die Laufrad-Gruppe. Es scheint daher höchst wahrscheinlich, dass, im Vergleich zum Laufbandtraining, das Laufradtraining eher einem HIIT und nicht einem reinen Ausdauertraining entspricht. Dieses hat somit das Potential die Muskelhypertrophie zu stimulieren und den Körper in eine anabole Stoffwechsellage zu bringen.

Es ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, ob und wenn ja wie verschiedene Trainingsformen die Fasertyp-Zusammensetzung der Skelettmuskulatur beeinflussen können (*Fasertyp-Switching*). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen allerdings trainingsinduzierte Veränderungen der Expression des *MyH1*-Gens und des *MyH2*-Gens in bestimmten Muskeln, vor allem in der Laufrad-Gruppe, auf und weisen somit auf ein gewisses Maß an *Fasertyp-Switching* hin. Trotz wie erwähnt intensiverer Laufprotokolle beobachteten Kim et al. (2020) interessanterweise in einer ähnlichen Studie jedoch keine Auswirkungen auf die Fasertypen. Allerdings wurde in dieser Studie zur Ermittlung der Faserzusammensetzung nicht, wie in dieser Arbeit, eine qPCR-Analyse der *MyH*-Genexpression, sondern eine Methode der Faserfärbung zur Quantifizierung verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Analysemethoden kann es so zu Abweichungen in den Ergebnissen kommen.

In beiden Trainingsgruppen konnten zumeist nur geringfügige Auswirkungen des Trainings auf die Gene, die für Komponenten der miRNA-Biogenese kodieren, festgestellt werden. Auch andere Autoren konnten beobachten, dass Veränderungen von miRNA-Muster durchaus auch ohne starke Veränderungen der Konzentration von Komponenten des miRNA-Biosynthese-*Pathways* möglich sind (Oikawa et al., 2019; Vechetti et al., 2019). Dies könnte in der kürzeren Lebensdauer der miRNAs und ihrer damit verbundenen erhöhten Produktionsrate im Vergleich zu den langlebigeren Komponenten der miRNA Verarbeitungs-Maschinerie, begründet liegen. Im direkten Vergleich zwischen Laufband- und Laufradtraining wurden im *M. tibialis anterior* der Laufrad-Gruppe jedoch signifikant niedrigere Expressionswerte für *Drosha*, *Dgcr8* und *Xpo5* deutlich. Dies könnte in einem möglichen *Fasertyp-Switching* und einer daraus resultierenden differentiellen Expression der entsprechenden Gene begründet sein. Interessanterweise konnten Veränderungen bezüglich der miRNA-Muster dagegen überwiegend in den Muskeln der Laufrad-Gruppe nachgewiesen werden. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, die

zeigen sollten, inwieweit die jeweiligen Muskeln in unterschiedlichen Trainingsprogrammen Belastung erfahren und wie sich dies auf miRNA-Muster auswirkt. In der Laufrad-Gruppe konnten für die klassischen *myomiRs* zum Teil signifikante trainingsinduzierte Veränderungen nachgewiesen werden. So zeigten sich für miR-1 signifikante erhöhte Level im *M. tibialis anterior*. Da miR-1 bei Regenerationsprozessen eine wichtige Rolle spielt (Sun et al., 2010), erscheint dies plausibel. Bei jeder Belastung kommt es zu kleinsten Schäden innerhalb der Muskulatur, die regeneriert werden müssen, wobei diese Regenerationsvorgänge mit Anpassungsvorgängen der Muskulatur an die Belastung Hand in Hand gehen (Proske & Morgan, 2001). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Arbeit von Sun et al. (2010), wobei die Autoren nach einer provozierten Verletzung im *M. tibialis anterior* ebenfalls erhöhte miR-1-Konzentrationen finden konnten. Für miR-133b und miR-208b wurde dagegen im *M. gastrocnemius* im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Training eine verminderte Expression gemessen. miR-133b wird im Muskel zu Beginn der Regeneration reprimiert, bevor die Konzentration im weiteren Verlauf wieder ansteigt (Chen et al., 2006; Jeng et al., 2009). In Bezug auf miR-208b konnten Fu et al. (2020) zeigen, dass eine Induktion durch die gezielte Beeinflussung des Folliculin-interagierenden Proteins 1 (FNIP1) die Umwandlung von schnellen zu langsamen Muskelfasern und den oxidativen Metabolismus stimuliert. Wie oben bereits beschrieben, konnten in dieser Arbeit jedoch insbesondere erhöhte Werte für *Myh1* und *Myh2* nachgewiesen werden, welche für „schnelle“ Myosine kodieren. Im Umkehrschluss scheint es daher plausibel, dass miR-208b in Antwort auf das Laufradtraining reprimiert wird.

Für miR-107 zeigten sich signifikant erhöhte Expressionsniveaus sowohl im *M. tibialis anterior* als auch im *M. gastrocnemius*. Es konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die Konzentrationen von miR-107 bei einer Immobilisation deutlich sinken (McCarthy et al., 2009). Li et al. (2018) konnten zudem zeigen, dass miR-107 die Bildung von Myotuben signifikant hemmt, wodurch seine Funktion als negativer regulatorischer Faktor für die Myoblastendifferenzierung deutlich wurde. Daher ist eine Induktion dieser miRNA bei hypertrophieinduzierenden Prozessen, bei denen ja zunächst eine Proliferation von Myoblasten bzw. den regenerativen Myoblasten der Muskulatur, den sogenannten Satellitenzellen, erfolgen muss. Zudem vermuten die Autoren, dass diese miRNA die Apoptose von Myoblasten hemmt. Die hier gemessenen höheren Gehalte an miR-107 könnten also einen weiteren Hinweis für die gemessene Hypertrophie der untersuchten Muskeln sein, indem die Apoptose von Myoblasten gehemmt wird.

Die signifikante Repression von miR-20b im *M. tibialis anterior* und *M. gastrocnemius* in Antwort auf das Laufradtraining erscheint besonders interessant. Da diese miRNA die VEGF-Produktion negativ reguliert (Lei et al., 2009), könnte ihre Herunterregulierung die Angiogenese bei der Trainingsanpassung verbessern. Dies spricht, neben den Befunden zur Expression der „metabolischen“ Marker, dafür, dass das Laufradtraining trotz einer Induktion von Genen, die für „schnelle“ Myosin-Isoformen kodieren und einer hypertrophieinduzierenden Wirkung, auch eine oxidativ-metabolische Anpassungsreaktion vermittelt.

Zudem zeigte sich bei den Tieren der Laufrad-Gruppe im *M. gastrocnemius* eine signifikante Repression der miR-29a. Bereits in anderen Arbeiten konnte dabei interessanterweise festgestellt werden, dass miR-29 sowohl direkt als auch indirekt die Expression verschiedener Gene reguliert, die mit einer Atrophie der Skelettmuskulatur in Zusammenhang stehen (Smith et al., 2013; S. Zhang & Chen, 2018), so dass die beobachtete Repression in unserem Modellsystem gut mit der vermuteten Hypertrophie in Zusammenhang gebracht werden kann.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl ein Laufband- als auch ein Laufradtraining spezifische Effekte in der Muskulatur erzielen kann. Zum Teil waren diese für beide Trainingsformen vergleichbar, zum Teil aber auch stark unterschiedlich. Zudem waren die Effekte häufig sehr spezifisch für den jeweils untersuchten Muskeltyp. In Summe waren die meisten Anpassungseffekte allerdings bei den Tieren der Laufrad-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt.

Insgesamt sollten zukünftige Studien darauf abzielen, sowohl die Energieaufnahme als auch den Energieverbrauch der Tiere direkt zu kontrollieren und mit den Trainingseffekten der einzelnen Protokolle in Beziehung zu setzen. Auch die Effekte einer Kombination beider hier untersuchten Trainingsprogramme zu analysieren könnte interessante neue Punkte zeigen. Darüber hinaus könnte eine bessere Charakterisierung der Anpassungsreaktionen einzelner Muskeln von entscheidender Bedeutung sein. Schließlich sollten die miRNA-Muster in einem breiteren Spektrum und wegen der besseren Übertragbarkeit auf Nutz- und Haustiere und den Menschen in Zusammenhang mit einer Trainingssteuerung in der klinischen Routine möglicherweise auch im Blut analysiert werden.

5.3. Implementierung der Erkenntnisse im Hinblick auf das 3R-Prinzip

Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit rückt hier vor allem „*Refinement*“ in den Fokus. Bereits in diversen Studien konnte gezeigt werden, dass Mäuse einen ausgeprägten Drang zum Laufen haben. Dies konnte sowohl in einer Laborumgebung (Allen et al., 2001; Bartling et al., 2017; Konhilas et al., 2004; LaBarge et al., 2016; Lightfoot et al., 2004; Manzanares et al., 2018) als auch in freier Wildbahn (Meijer & Robbers, 2014) nachgewiesen werden.

Der Faktor „Stress“ stellt eine sehr schwer zu definierende Komponente eines jeden Tierversuchs dar. Aus der Sicht eines Tieres kann eine bestimmte Situation als negativ oder sogar lebensbedrohlich empfunden werden, auch wenn sie sich objektiv, also aus Sicht des Menschen, von außen nicht so darstellt (Jirkof et al., 2019). In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise darauf, dass das Laufverhalten im Laufrad dabei helfen könnte, Stress zu erkennen. Häger et al. (2018) konnten zeigen, dass die von Laufrädern abgeleitete Aktivität mit dem Schweregrad von Tierversuchen korreliert: Je angenehmer die Versuche für die Tiere sind, desto mehr laufen sie in dem Laufrad.

Insgesamt scheinen gestresste Tiere eine geringere tägliche Laufstrecke zurückzulegen als nicht gestresste (DeVallance et al., 2017). Dies könnte auch eine Ursache für die in dieser Arbeit festgestellten, mitunter inter- und intra-individuell deutlich divergierenden Laufleistungen sein. Wie oben bereits erwähnt, zeigten die Tiere in der oberen Etage des Käfiggestells eine geringere Laufleistung. Die exponiertere Position der Käfige könnte für die Tiere ein zusätzlicher Stressfaktor gewesen sein. Ein Tier zeigte konstant niedrigere Leistungslevel als die anderen. Hier könnte man auch ein höheres Stressniveau als Ursache vermuten, wobei nicht definiert werden kann, wodurch dieser erhöhte Stress verursacht wurde.

Eine subjektive Beobachtung im Verlauf des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuchs war, dass die Tiere der Laufrad-Gruppe deutlich leichter im Handling waren, als die der Kontroll-Gruppe. Hierfür könnte es zwei Ursachen geben. Zum einen ist es möglich, dass das regelmäßige Laufen zur Stressreduktion bei den Tieren beitrug. Zum anderen könnte eine Erklärung sein, dass die Tiere eine menschliche Intervention im Käfig eher gewohnt waren, da die Laufräder täglich kontrolliert und von der Einstreu befreit wurden.

Insgesamt könnte also die Implementierung von Laufrädern ein gutes Maß für die Messung von Stress und gegebenenfalls auch ein Instrumentarium zur Reduktion desselben bei Versuchstieren sein. Dabei scheint das Laufen im Rad der Natur von Mäusen zu entsprechen, kurze intervallartige Belastungen zu absolvieren. Angesichts

des Einflusses des Laufverhaltens auf das Verhalten und die Physiologie der Tiere besteht jedoch die Notwendigkeit einer sorgfältigen Interpretation der Ergebnisse, wenn Laufräder im Rahmen von Tierversuchen zur Messung der körperlichen Aktivität oder zur Steigerung des Wohlbefindens der Versuchstiere bzw. zur Stressreduktion eingesetzt werden sollen. Daher bedarf es hier weiterer Untersuchungen, bevor Laufräder gegebenenfalls als Standard etabliert werden könnten.

6. Zusammenfassung

Die trainingsinduzierten Veränderungen im menschlichen Muskel sind Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Die Anpassungsreaktion im murinen Muskel hingegen sind weniger ausführlich erforscht. Vor allem ein Vergleich verschiedener Trainingsprotokolle ist in der Literatur kaum zu finden. In den letzten Jahren sind vor allem microRNAs (miRNAs) als Frühmarker für Krankheiten und Anpassungsreaktionen im Körper in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. Es sind unzählige miRNAs bekannt, einige davon als sogenannte *myomiRs*, also miRNAs, die spezifisch für Muskelgewebe sind.

Mäuse als Modellorganismen sind bereits seit Jahrzehnten Mittelpunkt vieler und intensiver Forschungsarbeiten. Im Laufe der Zeit wurden Richtlinien zum Wohlbefinden der Tiere bestimmt, wie z.B. das 3R-Prinzip, und die wissenschaftlichen Methoden im Umgang mit den Tieren und zur Analyse diverser Fragestellungen verfeinert. Aber gerade in der heutigen Zeit rückt der Aspekt des Tierschutzes und des Wohlbefindens eben jener Tiere mehr und mehr in den Fokus.

Es ergab sich für diese Arbeit die Frage, welche Anpassungsreaktionen es an eine einmalige Laufbelastung und zwei unterschiedliche zehnwöchige Lauftrainingsprogramme im Mausmodell gibt und inwiefern sich die Ergebnisse für das „*Refinement*“, also die Verfeinerung von Tierversuchen, nutzen lassen.

Es wurde ein Trainingsmodell etabliert, bei dem Mäuse der Linie C57BL/6JJ einem zehnwöchigen Laufradtraining unterzogen wurden. Außerdem konnten Proben vorangegangener Versuche genutzt werden. Die dabei verwendeten Mäuse wurden entweder einem zehnwöchigen Laufbandtraining oder einer einmaligen „akuten“ Laufbelastung auf dem Laufband unterzogen. Für alle Analysen wurden Muskeln ausgewählt, die in ihrer Funktion antagonistisch bei der Beugung bzw. Streckung des Sprunggelenkes wirken: der *M. tibialis anterior* und der *M. gastrocnemius*.

Für eine akute Laufbelastung konnten zum Teil abweichende Effekte in den untersuchten Muskeln beobachtet werden. Während einige entzündungsassoziierte Gene (*Zfp36*, *Ho1*, *MafF*) eine Induktion zeigten, blieb sie bei anderen aus. Für die untersuchten miRNAs konnten keine nennenswerten Effekte beobachtet werden.

Nach einem zehnwöchigem Lauftrainingsprogramm konnten dagegen verschiedene Anpassungsreaktionen beobachtet werden. Während die Veränderungen nach einem zehnwöchigem Laufbandtraining jedoch verhältnismäßig gering ausfielen, waren die Effekte nach einem zehnwöchigen Laufradtraining deutlich ausgeprägter. Dies könnte

auf den deutlich unterschiedlichen zurückgelegten Laufstreckenberuhen: Wöchentlich legten die Tiere der Laufband-Gruppe im Rahmen des Trainings eine Strecke von rund 2,4 km zurück, während die Tiere der Laufrad-Gruppe eine durchschnittliche Laufstrecke von ca. 55 km absolvierten.

Zudem waren die Effekte der beiden Trainingsformen z.T. auch qualitativ unterschiedlich: Das Laufbandtraining führte beispielsweise zu einer Induktion des *Il-6-r*-Gens, während nach Laufradtraining reprimierende Effekte auf dieses Gen beobachtet werden konnten. Das *Pgc-1 α* -Gen zeigte hingegen eine deutliche Induktion, sowohl für die Laufband- als auch die Laufrad-Gruppe, während das *Cox4*-Gen nur in Antwort auf das Laufbandtraining induziert wurde. Nach einem Laufradtrainingsprogramm zeigten die Gene, die für Myosinschwerketten kodieren, allgemein höhere Expressionsniveaus. Die Auswirkungen auf verschiedene Gene, die für Komponenten der miRNA-Biogenese kodieren, waren dagegen bei beiden Trainingsformen nur geringfügig. Für die klassischen *myomiRs* konnten jedoch in der Laufrad-Gruppe zum Teil signifikante trainingsinduzierte Anpassungsreaktionen beobachtet werden. So zeigten sich für miR-1 signifikant erhöhte Expressionsniveaus im *M. tibialis anterior*. Für miR-29a, miR-133b und miR-208b wurde dagegen im *M. gastrocnemius* eine verminderte Expression gemessen. Für miR-107 zeigte sich eine Induktion sowohl im *M. tibialis anterior* als auch im *M. gastrocnemius*, während für miR-20b eine signifikante Repression in beiden untersuchten Muskeln nachgewiesen werden konnte. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl ein Laufband- als auch ein Laufradtraining spezifische, zum Teil vergleichbare, zum Teil aber auch stark unterschiedliche, Effekte in der Muskulatur erzielen kann. Manche Anpassungsreaktionen waren sehr spezifisch für nur einen der beiden untersuchten Muskeln, während andere in beiden beobachtet wurden. Allerdings fanden sich bei den Tieren der Laufrad-Gruppe in Summe stärker ausgeprägte Anpassungseffekte.

Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit rückt für das 3R-Prinzip vor allem „*Refinement*“ in den Fokus. Es wird vermutet, dass das Laufverhalten im Laufrad dabei helfen könnte, Stress von Versuchstieren besser zu erkennen. In dieser Arbeit konnten inter- und intra-individuell deutlich divergierenden Laufleistungen beobachtet werden. Zudem zeigten die untersuchten Tiere eine geringere Laufleistung, wenn ihr Käfig in der oberen Etage des Käfiggestells positioniert war, was dafürspricht, dass der Tatsache Beachtung geschenkt werden muss, dass die Laufleistung durch eine Vielzahl von, z.T. vermutlich noch unbekanntem, Faktoren bedingt wird. Eine subjektive Beobachtung dieser Arbeit war

auch, dass die Tiere der Laufrad-Gruppe deutlich entspannter im Umgang waren, als die der Kontroll-Gruppe. Es scheint somit möglich, dass das regelmäßige Laufen zur Stressreduktion bei den Tieren beitrug. Insgesamt könnte also die Implementierung von Laufrädern ein gutes Maß für die Messung von Stress und gegebenenfalls auch ein Instrumentarium zur Reduktion desselben bei Versuchstieren sein. Es bedarf allerdings weiterer Untersuchungen dazu, inwiefern Studienergebnisse durch das Laufen beeinflusst werden könnten, bevor Laufräder gegebenenfalls als Standard etabliert werden könnten. Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass alle beschriebenen Ergebnisse vor allem durch die kleine Stichprobengröße und die kleine Anzahl der analysierten Gene im Sinne einer Pilotstudie als vorläufig zu betrachten sind und ihre Aussagekraft daher limitiert ist.

7. Summary

Training-induced changes in human muscle are subject to numerous studies. Adaptation reactions in murine muscle, however, have been less thoroughly analyzed. In particular, only very few data regarding the comparison of different training protocols can be found in the literature. In recent years, microRNAs (miRNAs) as early markers for diseases and adaptation reactions in the body have gained scientific attention. Countless miRNAs are known, some of which are known as *myomiRs*, miRNAs that are specific for muscle tissue.

Mice as model organisms have been the focus of intense research for decades. In the course of time, guidelines for animal welfare have been established, such as the 3R principle, and scientific methods for handling animals and analyzing different types of scientific questions have been refined. However, nowadays, the issue of animal welfare and well-being is becoming more and more important.

This thesis aimed at analyzing which adaptation reactions occur in response to a single bout of running and two different ten-week running training regimens in the mouse and to what extent the results can be used for the refinement of animal experiments.

A training model was established in which mice of the C57BL/6J strain underwent ten weeks of running wheel training. In addition, samples from previous experiments were used. In those experiments, mice were subjected to either a ten-week treadmill training or a single, moderate-intensity bout of running on the treadmill. For all analyses, muscles were chosen, which function antagonistically during flexion or extension of the ankle joint: the *tibialis anterior* muscle and the *gastrocnemius* muscle.

In response to the acute bout of treadmill running, characteristic effects were observed in the muscles examined. While some inflammation-associated genes (*Zfp36*, *Ho1*, *MafF*) were induced, others were not. Metabolic markers like *Nr4a3* and *Pgc-1 α* also showed increased expression. For the miRNAs examined, however, no significant effects could be observed.

Similarly, after a ten-week running training program, specific adaptation reactions could be found. However, while the changes after a ten-week forced treadmill running program (ftr) were relatively small, the effects that could be observed after a ten-week voluntary wheel running program (vwr) were much more pronounced. This could be due to the significantly different distances run: ftr animals covered a weekly distance of about 2.4

km during training, while animals of the vwr group completed an average running distance of about 55 km.

In addition, the effects of the two training forms were also qualitatively different: ftr led to an induction of the *Il-6-r* gene, while repressive effects on this gene were observed after vwr. In contrast, the *Pgc-1 α* gene showed a clear induction, both for the treadmill and the running wheel group, while the *Cox4* gene was induced only in response to ftr. After vwr, the genes coding for myosin heavy chains generally showed higher expression levels. In contrast, the effect on various genes encoding components of the miRNA biogenesis was only minor in response to both types of training. Nevertheless, for the classical *myomiRs*, significant training-induced adaptations could be observed after vwr. miR-1 concentrations were significantly increased in the *tibialis anterior* muscle. For miR-29a, miR-133b and miR-208b, however, reduced levels were measured in the *gastrocnemius* muscle. Induction of *miR-107* was found in both the *tibialis anterior* and *gastrocnemius*, while significant repression of miR-20b was observed in both muscles. Overall, the results suggest that both treadmill and running wheel training induce specific effects in skeletal muscle tissue, with some of which being similar, and others very different between the two training regimens. In addition, some adaptation reactions were very specific for only one of the two muscles studied, while others were observed in both. However, overall, adaptation effects appeared more pronounced in response to wheel running.

With regard to the 3R principle, the results of this study might be helpful with regard to the refinement of animal experiments. It has been assumed that monitoring voluntary running behavior in wheels might help to better detect stress in laboratory animals. Here, we found that running patterns showed a high degree of both inter- and intra-individual variability. In particular, we found that animals ran lower distances when their cages were positioned in the upper tier of the cage rack, a finding that suggests that running performance is caused by a variety of factors, some of which are probably still unknown. In addition, a subjective impression was that animals of the running wheel group were much more relaxed during handling than those of the control group. Therefore, it seems possible that regular wheel running might contribute to stress reduction. Thus, overall, implementation of running wheels might not only be a means for the detection of stress levels, but possibly also a tool for stress reduction in laboratory animals. However, further research is needed to determine how running affects the results of different types of scientific studies before wheels could be established as a standard. Finally and most importantly, it should be noted that due to the small sample size, almost all of the results

Summary

of this study are to be considered preliminary, and experiments should be repeated with larger animal cohorts in the future.

8. Eigene Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Schmitt, A., Brändle, A.-L., **Herzog, P.**, Röchner, F., Fragasso, A., & Munz, B. (2020). **Effects of the anti-oxidant PDTTC in combination with a single bout of treadmill running on murine skeletal muscle.** Redox Report : Communications in Free Radical Research, 25(1), 70–79.

Schmitt, A., **Herzog, P.**, Röchner, F., Brändle, A., Fragasso, A., & Munz, B. (2020). **Skeletal muscle effects of two different 10-week exercise regimens, voluntary wheel running, and forced treadmill running, in mice: A pilot study.** Physiological Reports, 8(20), e14609.

9. Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an Frau Prof. Dr. Barbara Munz für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit in der Abteilung Sportmedizin meine Versuche durchführen zu können.

Weiters danke ich Frau Prof. Dr. Stephanie Krämer. Dank Ihnen war es möglich als externer Doktorand in Gießen zu promovieren.

Von ganzem Herzen danke ich Thomas Beiter für die tatkräftige Unterstützung und Annunziata Fragasso zusätzlich für den emotionalen Beistand. Ohne euch hätte ich das Projekt vermutlich nicht durchgezogen.

Mein tiefster Dank gebührt meiner Mutter für ihre uneingeschränkte Unterstützung in jeder Situation und dem immerwährendem Gefühl von „Zuhause“.

Und zuletzt danke ich meinem Verlobten: Du hast immer Geduld bewiesen, wenn ich mal wieder alles durch die Gegend schmeißen wollte und bist mein Fels in der Brandung!

Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Literaturverzeichnis

- Abu-Libdeh, B., Douiev, L., Amro, S., Shahrour, M., Ta-Shma, A., Miller, C., Elpeleg, O., & Saada, A. (2017). Mutation in the COX4I1 gene is associated with short stature, poor weight gain and increased chromosomal breaks, simulating Fanconi anemia. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 25(10), 1142–1146.
- Allen, D. L., Harrison, B. C., Maass, A., Bell, M. L., Byrnes, W. C., & Leinwand, L. A. (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *Journal of Applied Physiology*, 90(5), 1900–1908.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(3), 277–279.
- Andersen, J. L., Klitgaard, H., & Saltin, B. (1994). Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiologica Scandinavica*, 151(2), 135–142.
- Augusto, V., Padovani, C. R., Eduardo, G., & Campos, R. (2004). Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Journal of Morphological Sciences*, 21(21), 89–94.
- Bailoo, J. D., Murphy, E., Boada-Saña, M., Varholick, J. A., Hintze, S., Baussièrè, C., Hahn, K. C., Göpfert, C., Palme, R., Voelkl, B., & Würbel, H. (2018). Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 232.
- Bakheet, T., Frevel, M., Williams, B. R., Greer, W., & Khabar, K. S. (2001). ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 246–254.
- Banjanin, S., & Mrosovsky, N. (2000). Preferences of mice, *Mus musculus*, for different types of running wheel. *Laboratory Animals*, 34(3), 313–318.
- Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H. J., Ahmadian, M. R., Moll, J. M., & Scheller, J. (2018). The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(18), 6762–6775.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233.
- Bartling, B., Al-Robaiy, S., Lehnich, H., Binder, L., & Hiebl, B. (2017). Sex-related differences in the wheel-running activity of mice decline with increasing age. *Experimental Gerontology*, 87, 139–147.
- Beals, M., Gross, L., & Harrell, S. (1999). *HALF LIFE OF mRNA*.
- Beiter, T., Hoene, M., Prenzler, F., Mooren, F. C., Steinacker, J. M., Weigert, C., Nieß, A. M., & Munz, B. (2015). Exercise, skeletal muscle and inflammation: ARE-binding

- proteins as key regulators in inflammatory and adaptive networks. In *Exercise Immunology Review*.
- Betts, J. G., Desaix, P., Johnson, E. W., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J., Womble, M. D., Young, K. A., & OpenStax College. (2013). *Anatomy & Physiology*.
- Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 307(6), E469-84.
- Booth, F. W., & Thomason, D. B. (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiological Reviews*, 71(2), 541–585.
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(12), 1097–1101.
- Brummer, H., Zhang, M. Y., Piddoubny, M., & Medler, S. (2013). Hybrid Fibers Transform into Distinct Fiber Types in Maturing Mouse Muscles. *Cells Tissues Organs*, 198(3), 227–236.
- Bundesinstitut für Risikobewertung. (2020). *3R Prinzip - BfR*.
- Butcher, J. T., Ali, M. I., Ma, M. W., McCarthy, C. G., Islam, B. N., Fox, L. G., Mintz, J. D., Larion, S., Fulton, D. J., & Stepp, D. W. (2017). Effect of myostatin deletion on cardiac and microvascular function. *Physiological Reports*, 5(23).
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., & Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development*, 16(21), 2733–2742.
- Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., Bang, M.-L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., & Labeit, S. (2001). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *Journal of Molecular Biology*, 306(4), 717–726.
- Chan, M. C., Ziegler, O., Liu, L., Rowe, G. C., Das, S., Otterbein, L. E., & Arany, Z. (2016). Heme oxygenase and carbon monoxide protect from muscle dystrophy. *Skeletal Muscle*, 6(1), 41.
- Chen, J.-F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L., & Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, 38(2), 228–233.
- Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R. K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G. C., Sawada, N., Raghuram, S., & Arany, Z. (2009). The transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21401–21406.
- Cho, J., Kim, S., Lee, S., & Kang, H. (2015). Effect of Training Intensity on Nonalcoholic

- Fatty Liver Disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 47(8), 1624–1634.
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., & Gregorio, C. C. (2002). Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 637–706.
- Clipperton-Allen, A. E., & Page, D. T. (2015). Decreased aggression and increased repetitive behavior in Pten haploinsufficient mice. *Genes, Brain and Behavior*, 14(2), 145–157.
- Craig, A., Mai, J., Cai, S., & Jeyaseelan, S. (2009). Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infection and Immunity*, 77(2), 568–575.
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235.
- DeVallance, E., Riggs, D., Jackson, B., Parkulo, T., Zaslau, S., Chantler, P. D., Olfert, I. M., & Bryner, R. W. (2017). Effect of chronic stress on running wheel activity in mice. *PloS One*, 12(9), e0184829.
- Egan, B., & Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, 17(2), 162–184.
- Ferraro, E., Giammarioli, A. M., Chiandotto, S., Spoletini, I., & Rosano, G. (2014). Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(1), 154–176.
- Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise Immunology Review*, 12, 6–33.
- Flück, M., & Hoppeler, H. (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (pp. 159–216). Springer Berlin Heidelberg.
- Flück, Martin, Kramer, M., Fitze, D. P., Kasper, S., Franchi, M. V., & Valdivieso, P. (2019). Cellular Aspects of Muscle Specialization Demonstrate Genotype - Phenotype Interaction Effects in Athletes. *Frontiers in Physiology*, 10, 526.
- Foletta, V., White, L., Larsen, A., Léger, B., & Russell, A. (2011). The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. In *Pflügers Archiv: European journal of physiology* (Vol. 461).
- Fu, L., Wang, H., Liao, Y., Zhou, P., Xu, Y., Zhao, Y., Xie, S., Zhao, S., & Li, X. (2020). miR-208b modulating skeletal muscle development and energy homeostasis through targeting distinct targets. *RNA Biology*, 17(5), 743–754.
- Garland, T., Schutz, H., Chappell, M. A., Keeney, B. K., Meek, T. H., Copes, L. E., Acosta, W., Drenowatz, C., Maciel, R. C., van Dijk, G., Kotz, C. M., Eisenmann, J. C., & Eisenmann, J. C. (2011). The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and

- rodent perspectives. *The Journal of Experimental Biology*, 214(Pt 2), 206–229.
- Garvey, S. M., Russ, D. W., Skelding, M. B., Dugle, J. E., & Edens, N. K. (2015). Molecular and metabolomic effects of voluntary running wheel activity on skeletal muscle in late middle-aged rats. *Physiological Reports*, 3(2).
- Goode, J. M., Pearen, M. A., Tuong, Z. K., Wang, S.-C. M., Oh, T. G., Shao, E. X., & Muscat, G. E. O. (2016). The Nuclear Receptor, Nor-1, Induces the Physiological Responses Associated With Exercise. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 30(6), 660–676.
- Goodpaster, B. H., Katsiaras, A., & Kelley, D. E. (2003). Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*, 52(9), 2191–2197.
- Greenberg, J. R. (1972). High Stability of Messenger RNA in Growing Cultured Cells. *Nature*, 240(5376), 102–104.
- Gudiksen, A., Schwartz, C. L., Bertholdt, L., Joensen, E., Knudsen, J. G., & Pilegaard, H. (2016). Lack of Skeletal Muscle IL-6 Affects Pyruvate Dehydrogenase Activity at Rest and during Prolonged Exercise. *PloS One*, 11(6), e0156460.
- Güller, I., & Russell, A. P. (2010). MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 21), 4075–4087.
- Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 86(3), 564–600.
- Häger, C., Keubler, L. M., Talbot, S. R., Biernot, S., Weegh, N., Buchheister, S., Buettner, M., Glage, S., & Bleich, A. (2018). Running in the wheel: Defining individual severity levels in mice. *PLoS Biology*, 16(10), e2006159.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18(24), 3016.
- Hawley, J. A. (2002). Adaptations Of Skeletal Muscle To Prolonged, Intense Endurance Training. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(3), 218–222.
- Hill, W. F. (1958). The effect of various periods of confinement on activity in tilt cages. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 51(5), 570–574.
- Hoppeler, H., Baum, O., Lurman, G., & Mueller, M. (2011). Molecular Mechanisms of Muscle Plasticity with Exercise. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 1, pp. 1383–1412). John Wiley & Sons, Inc.
- Horak, M., Novak, J., & Bienertova-Vasku, J. (2016). Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology*, 410(1), 1–13.
- Jeng, S.-F., Rau, C.-S., Liliang, P.-C., Wu, C.-J., Lu, T.-H., Chen, Y.-C., Lin, C.-J., &

- Hsieh, C.-H. (2009). Profiling Muscle-Specific MicroRNA Expression after Peripheral Denervation and Reinnervation in a Rat Model. *Journal of Neurotrauma*, 26(12), 2345–2353.
- Jergenson, M., Le, G., & Lowe, D. A. (2015). *Expression of Pro-inflammatory Chemokines CXCL1 and CXCL5 is Rapidly Upregulated Following Traumatic Injury*.
- Jirkof, P., Rudeck, J., & Lewejohann, L. (2019). Assessing Affective State in Laboratory Rodents to Promote Animal Welfare-What Is the Progress in Applied Refinement Research? *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 9(12).
- Kannan, M. B., Solovieva, V., & Blank, V. (2012). The small MAF transcription factors MAFF, MAFG and MAFK: Current knowledge and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(10), 1841–1846.
- Kawasaki, E., Hokari, F., Sasaki, M., Sakai, A., Koshinaka, K., & Kawanaka, K. (2011). The effects of β -adrenergic stimulation and exercise on NR4A3 protein expression in rat skeletal muscle. *The Journal of Physiological Sciences*, 61(1), 1–11.
- Keller, C., Steensberg, A., Hansen, A. K., Fischer, C. P., Plomgaard, P., & Pedersen, B. K. (2005). Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 99(6), 2075–2079.
- Kim, S., Song, M. L., Min, H., Hwang, I., Baek, S. K., Kwon, T. K., & Park, J.-W. (2017). miRNA biogenesis-associated RNase III nucleases Drosha and Dicer are upregulated in colorectal adenocarcinoma. *Oncology Letters*, 14(4), 4379–4383.
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126–139.
- Kim, Y. J., Kim, H. J., Lee, W. J., & Seong, J. K. (2020). A comparison of the metabolic effects of treadmill and wheel running exercise in mouse model. *Laboratory Animal Research*, 36(1), 3.
- Konhilas, J. P., Maass, A. H., Luckey, S. W., Stauffer, B. L., Olson, E. N., & Leinwand, L. A. (2004). Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(6), H2768-76.
- Krebs, C., Singleton, G., & Kenney, A. (1994). Six reasons why feral house mouse populations might have low recapture rates. *Wildlife Research*, 21(5), 559.
- Kupr, B., Schnyder, S., & Handschin, C. (2017). Role of Nuclear Receptors in Exercise-Induced Muscle Adaptations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(6).
- LaBarge, S. A., Migdal, C. W., Buckner, E. H., Okuno, H., Gertsman, I., Stocks, B., Barshop, B. A., Nalbandian, S. R., Philp, A., McCurdy, C. E., & Schenk, S. (2016). p300 is not required for metabolic adaptation to endurance exercise training. *The FASEB Journal*, 30(4), 1623.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853 LP – 858.

- Lai, W. S., Stumpo, D. J., & Blackshear, P. J. (1990). Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(27), 16556–16563.
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862 LP – 864.
- Lee, S.-J. (2004). REGULATION OF MUSCLE MASS BY MYOSTATIN. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 61–86.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663–4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060.
- Lei, Z., Li, B., Yang, Z., Fang, H., Zhang, G.-M., Feng, Z.-H., & Huang, B. (2009). Regulation of HIF-1 α and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration. *PloS One*, 4(10), e7629.
- Lenk, K., Schuler, G., & Adams, V. (2010). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: Molecular pathophysiology and impact of exercise training. In *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.
- Li, H., Wei, X., Yang, J., Dong, D., Hao, D., Huang, Y., Lan, X., Plath, M., Lei, C., Ma, Y., Lin, F., Bai, Y., & Chen, H. (2018). circFGFR4 Promotes Differentiation of Myoblasts via Binding miR-107 to Relieve Its Inhibition of Wnt3a. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 11, 272–283.
- Lieber, R. L., & Friden, J. (2001). Clinical Significance of Skeletal Muscle Architecture. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 383(383), 140–151.
- Lightfoot, J. T., Turner, M. J., Daves, M., Vordermark, A., & Kleeberger, S. R. (2004). Genetic influence on daily wheel running activity level. *Physiological Genomics*, 19(3), 270–276.
- Lira, V. A., Benton, C. R., Yan, Z., & Bonen, A. (2010). PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 299(2), E145-61.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lodish, H. F. (2000). *Molecular cell biology*. W.H. Freeman.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export

- of MicroRNA Precursors. *Science*, 303(5654), 95–98.
- Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N., & Bhasin, S. (2001). Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 281(6), E1128–E1136.
- Manzanares, G., Brito-da-Silva, G., & Gandra, P. G. (2018). Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 52(1), e7830.
- Martinez-Huenchullan, S. F., Ban, L. A., Olaya-Agudo, L. F., Maharjan, B. R., Williams, P. F., Tam, C. S., Mclennan, S. V., & Twigg, S. M. (2019). Constant-Moderate and High-Intensity Interval Training Have Differential Benefits on Insulin Sensitive Tissues in High-Fat Fed Mice. *Frontiers in Physiology*, 10, 459.
- Marzi, M. J., Ghini, F., Cerruti, B., de Pretis, S., Bonetti, P., Giacomelli, C., Gorski, M. M., Kress, T., Pelizzola, M., Muller, H., Amati, B., & Nicassio, F. (2016). Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome Research*, 26(4), 554–565.
- Mason, G., Clubb, R., Latham, N., & Vickery, S. (2007). Why and how we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? *Applied Animal Behaviour Science - APPL ANIM BEHAV SCI*, 102, 163–188.
- McCarthy, J. J. (2008). MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779(11), 682–691.
- McCarthy, J. J. (2011). The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 39(3), 150–154.
- McCarthy, J. J., Esser, K. A., Peterson, C. A., & Dupont-Versteegden, E. E. (2009). Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiological Genomics*, 39(3), 219–226.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M., & Lee, S.-J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. *Nature*, 387(6628), 83–90.
- Meijer, J. H., & Robbers, Y. (2014). Wheel running in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1786), 20140210.
- Merle, A., Jollet, M., Britto, F. A., Goustard, B., Bendridi, N., Rieusset, J., Ollendorff, V., & Favier, F. B. (2019). Endurance exercise decreases protein synthesis and ER-mitochondria contacts in mouse skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 127(5), 1297–1306.
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 122, 143–159.
- Nabben, M., & Hoeks, J. (2008). Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiology & Behavior*, 94(2), 259–269.

- Nader, G. A., & Esser, K. A. (2001). Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(5), 1936–1942.
- Nedachi, T., Fujita, H., & Kanzaki, M. (2008). Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(5), E1191–E1204.
- Nehlsen-Cannarella, S. L., Fagoaga, O. R., Nieman, D. C., Henson, D. A., Butterworth, D. E., Schmitt, R. L., Bailey, E. M., Warren, B. J., Utter, A., & Davis, J. M. (1997). Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *Journal of Applied Physiology*, 82(5), 1662–1667.
- Neubauer, O., Sabapathy, S., Ashton, K. J., Desbrow, B., Peake, J. M., Lazarus, R., Wessner, B., Cameron-Smith, D., Wagner, K.-H., Haseler, L. J., & Bulmer, A. C. (2014). Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. *Journal of Applied Physiology*, 116(3), 274–287.
- Niess, A. M., Passek, F., Lorenz, I., Schneider, E. M., Dickhuth, H.-H., Northoff, H., & Fehrenbach, E. (1999). Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes: Acute and adaptational responses to endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1–2), 184–192.
- North, K. N., Yang, N., Wattanasirichaigoon, D., Mills, M., Easteal, S., & Beggs, A. H. (1999). A common nonsense mutation results in α -actinin-3 deficiency in the general population. *Nature Genetics*, 21(4), 353–354.
- Oikawa, S., Lee, M., Motohashi, N., Maeda, S., & Akimoto, T. (2019). An inducible knockout of Dicer in adult mice does not affect endurance exercise-induced muscle adaptation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 316(2), C285–C292.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., & Tsukihara, T. (2009). A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science*, 326(5957), 1275–1279.
- Okamura, K., & Lai, E. C. (2008). Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(9), 673–678.
- Ostrowski, K., Hermann, C., Bangash, A., Schjerling, P., Nielsen, J. N., & Pedersen, B. K. (1998). A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *The Journal of Physiology*, 513 (Pt 3)(Pt 3), 889–894.
- Papachristou, D. J., Korpetinou, A., Giannopoulou, E., Antonacopoulou, A. G., Papadaki, H., Grivas, P., Scopa, C. D., & Kalofonos, H. P. (2011). Expression of the ribonucleases Droscha, Dicer, and Ago2 in colorectal carcinomas. *Virchows Archiv*, 459(4), 431–440.
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 271–282.
- Patel, K., & Amthor, H. (2005). The function of Myostatin and strategies of Myostatin

- blockade—new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders*, 15(2), 117–126.
- Pattamaprapanont, P., Garde, C., Fabre, O., & Barrès, R. (2016). Muscle Contraction Induces Acute Hydroxymethylation of the Exercise-Responsive Gene Nr4a3 . In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 7, p. 165).
- Pearen, M. A., & Muscat, G. E. O. (2012). Orphan Nuclear Receptors and the Regulation of Nutrient Metabolism: Understanding Obesity. *Physiology*, 27(3), 156–166.
- Pedersen, B K, Steensberg, A., & Schjerling, P. (2001). Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *The Journal of Physiology*, 536(Pt 2), 329–337.
- Pedersen, Bente Klarlund, & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiological Reviews*, 80(3), 1055–1081.
- Pette, D., & Staron, R. S. (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *International Review of Cytology*, 170, 143–223.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36.
- Pickering, C., & Kiely, J. (2017). ACTN3: More than Just a Gene for Speed. *Frontiers in Physiology*, 8, 1080.
- Polakovičová, M., Musil, P., Laczó, E., Hamar, D., & Kyselovič, J. (2016). Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Exercise Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10).
- Popov, D. V, Lysenko, E. A., Makhnovskii, P. A., Kurochkina, N. S., & Vinogradova, O. L. (2017). Regulation of PPARGC1A gene expression in trained and untrained human skeletal muscle. *Physiological Reports*, 5(23).
- Proske, U., & Morgan, D. L. (2001). Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *The Journal of Physiology*, 537(Pt 2), 333–345.
- Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocrine Reviews*, 24(1), 78–90.
- Rasbach, K. A., Gupta, R. K., Ruas, J. L., Wu, J., Naseri, E., Estall, J. L., & Spiegelman, B. M. (2010). PGC-1 α regulates a HIF2 α -dependent switch in skeletal muscle fiber types. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21866–21871.
- Russell, A. P., Lamon, S., Boon, H., Wada, S., Güller, I., Brown, E. L., Chibalin, A. V., Zierath, J. R., Snow, R. J., Stepto, N., Wadley, G. D., & Akimoto, T. (2013). Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *Journal of Physiology*.

- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen.
- Safdar, A., Abadi, A., Akhtar, M., Hettinga, B. P., & Tarnopolsky, M. A. (2009). miRNA in the Regulation of Skeletal Muscle Adaptation to Acute Endurance Exercise in C57BL/6JJ Male Mice. *PLoS ONE*.
- Savage, K. J., & McPherron, A. C. (2010). ENDURANCE EXERCISE TRAINING IN MYOSTATIN NULL MICE. *Muscle & Nerve*, 42(3), 355.
- Scarpulla, R. C. (2008). Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiological Reviews*, 88(2), 611–638.
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447–1531.
- Schiaffino, S., Sandri, M., & Murgia, M. (2007). Activity-Dependent Signaling Pathways Controlling Muscle Diversity and Plasticity. *Physiology*, 22(4), 269–278.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, 5(3), R13.
- Sharova, L. V, Sharov, A. A., Nedorezov, T., Piao, Y., Shaik, N., & Ko, M. S. H. (2009). Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 16(1), 45–58.
- Siomi, H., & Siomi, M. C. (2010). Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. In *Molecular Cell* (Vol. 38, Issue 3, pp. 323–332).
- Smith, S. S., Kessler, C. B., Shenoy, V., Rosen, C. J., & Delany, A. M. (2013). IGF-I 3' untranslated region: strain-specific polymorphisms and motifs regulating IGF-I in osteoblasts. *Endocrinology*, 154(1), 253–262.
- Spencer, J. A., Eliazer, S., Ilaria, R. L., Richardson, J. A., Olson, E. N., & Olson, E. N. (2000). Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *The Journal of Cell Biology*, 150(4), 771–784.
- Steinacker, J. M. (2002). Strukturanpassungen des Skelettmuskels auf Training. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 53(12), S. 354-360.
- Sun, Y., Ge, Y., Drnevich, J., Zhao, Y., Band, M., & Chen, J. (2010). Mammalian target of rapamycin regulates miRNA-1 and follistatin in skeletal myogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 189(7), 1157–1169.
- Sylviana, N., Natalia, C., Goenawan, H., Pratiwi, Y. S., Setiawan, I., Tarawan, V. M., Nurhayati, T., Rezano, A., Juliati, J., Purba, A., Supratman, U., & Lesmana, R. (2019). Effect of Short-Term Endurance Exercise on COX IV and PGC-1 α mRNA Expression Levels in Rat Skeletal Muscle. *Biomedical & Pharmacology Journal*,

12(3), 1309–1316.

- van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J., & Olson, E. N. (2009). A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. *Developmental Cell*.
- Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., & Olson, E. N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*.
- Varnum, B. C., Ma, Q. F., Chi, T. H., Fletcher, B., & Herschman, H. R. (1991). The TIS11 primary response gene is a member of a gene family that encodes proteins with a highly conserved sequence containing an unusual Cys-His repeat. *Molecular and Cellular Biology*, 11(3), 1754–1758.
- Vechetti, I. J., Wen, Y., Chaillou, T., Murach, K. A., Alimov, A. P., Figueiredo, V. C., Dal-Pai-Silva, M., & McCarthy, J. J. (2019). Life-long reduction in myomiR expression does not adversely affect skeletal muscle morphology. *Scientific Reports*, 9(1), 5483.
- Vesely, M. J., Exon, D. J., Clark, J. E., Foresti, R., Green, C. J., & Motterlini, R. (1998). Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. *The American Journal of Physiology*, 275(4 Pt 1), C1087-94.
- Vogt, S., Ruppert, V., Pankuweit, S., Paletta, J. P. J., Rhiel, A., Weber, P., Iqrsusi, M., Cybulski, P., & Ramzan, R. (2018). Myocardial insufficiency is related to reduced subunit 4 content of cytochrome c oxidase. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 13(1), 95.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(11), 1231–1243.
- Wang, N., Liu, Y., Ma, Y., & Wen, D. (2017). High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. *Life Sciences*, 191, 122–131.
- Weiss, A., McDonough, D., Wertman, B., Acakpo-Satchivi, L., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Leinwand, L., & Krauter, K. (1999). Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2958–2963.
- Wende, A. R., Schaeffer, P. J., Parker, G. J., Zechner, C., Han, D.-H., Chen, M. M., Hancock, C. R., Lehman, J. J., Huss, J. M., McClain, D. A., Holloszy, J. O., & Kelly, D. P. (2007). A Role for the Transcriptional Coactivator PGC-1 α in Muscle Refueling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36642–36651.
- Widmann, M., Nieß, A. M., & Munz, B. (2019). Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. *Sports Medicine*, 49(4), 509–523.
- Winbanks, C. E., Ooi, J. Y. Y., Nguyen, S. S., McMullen, J. R., & Bernardo, B. C. (2014).

- MicroRNAs differentially regulated in cardiac and skeletal muscle in health and disease: Potential drug targets? *Proceedings of the Australian Physiological Society*, 45, 1–13.
- Wu, H., Deng, Y., Feng, Y., Long, D., Ma, K., Wang, X., Zhao, M., Lu, L., & Lu, Q. (2018). Epigenetic regulation in B-cell maturation and its dysregulation in autoimmunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(7), 676–684.
- Wu, K., He, J., Pu, W., & Peng, Y. (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(2), 120–126.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75–84.
- Yang, Q., Li, W., She, H., Dou, J., Duong, D. M., Du, Y., Yang, S.-H., Seyfried, N. T., Fu, H., Gao, G., & Mao, Z. (2015). Stress induces p38 MAPK-mediated phosphorylation and inhibition of Drosha-dependent cell survival. *Molecular Cell*, 57(4), 721–734.
- Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M. R., & Kim, V. N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research*, 34(16), 4622–4629.
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(1), 112–123.
- Zhang, L., Zhou, Y., Wu, W., Hou, L., Chen, H., Zuo, B., Xiong, Y., & Yang, J. (2017). Skeletal Muscle-Specific Overexpression of PGC-1 α Induces Fiber-Type Conversion through Enhanced Mitochondrial Respiration and Fatty Acid Oxidation in Mice and Pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 13(9), 1152–1162.
- Zhang, S., & Chen, N. (2018). Regulatory Role of MicroRNAs in Muscle Atrophy during Exercise Intervention. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 405.
- Zhou, M., Lin, B.-Z., Coughlin, S., Vallega, G., & Pilch, P. F. (2000). UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 279(3), E622–E629.
- Zierath, J. R., & Hawley, J. A. (2004). Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biology*, 2(10), e348.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Übersicht und Eigenschaften der verschiedenen Muskelfasertypen ___5

Tabelle 4-1: Laufleistung Im Laufrad während der zehnwöchigen Versuchsdauer _69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Skelettmuskels _____ 1

Abbildung 1-2: miRNA Reifung innerhalb der Zelle _____ 12

Abbildung 4-1: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene *Il-6* und *Il-6-r* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 30

Abbildung 4-2: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene *Cxcl5* und *Zfp36* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 31

Abbildung 4-3: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens *Ho1* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 32

Abbildung 4-4: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens *MafF* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 33

Abbildung 4-5: Analyse der Expression des mit dem Skelettmuskelmetabolismus assoziierten Gens *Nr4a3* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 34

Abbildung 4-6: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene *Ucp3* und *Cox4* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 35

Abbildung 4-7: Analyse der Expression des mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gens *Pgc-1 α* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 36

Abbildung 4-8: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene *Myh1* und *Myh2* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 38

Abbildung 4-9: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene *Myh7* und *Actn3* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 39

Abbildung 4-10: Analyse der Expression des mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gens *Mstn* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 40

Abbildung 4-11: Analyse der Expression des mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gens *Murf1* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 41

Abbildung 4-12: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Drosha* und *Dgcr8* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 43

Abbildung 4-13: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene *Dicer11* und *Xpo5* auf RNA-Ebene in Antwort auf eine Laufbelastung _____ 44

Abbildung 4-14: Analyse der Expression von miR-1 in Antwort auf eine Laufbelastung	45
Abbildung 4-15: Analyse der Expression von miR-107 in Antwort auf eine Laufbelastung	46
Abbildung 4-16: Analyse der Expression von miR-133a und miR-133b in Antwort auf eine Laufbelastung	47
Abbildung 4-17: Analyse der Expression von miR-206 und miR-208b in Antwort auf eine Laufbelastung	48
Abbildung 4-18: Analyse der Expression von miR-20a und miR-20b in Antwort auf eine Laufbelastung	49
Abbildung 4-19: Analyse der Expression von miR-29a in Antwort auf eine Laufbelastung	50
Abbildung 4-20: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene <i>Il-6-r</i> und <i>Zfp36</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	52
Abbildung 4-21: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens <i>Ho1</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	53
Abbildung 4-22: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene <i>Ucp3</i> und <i>Cox4</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	54
Abbildung 4-23: Analyse der Expression des mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gens <i>Pgc-1α</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	55
Abbildung 4-24: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene <i>Myh1</i> und <i>Myh2</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	56
Abbildung 4-25: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene <i>Myh7</i> und <i>Actn3</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	57
Abbildung 4-26: Analyse der Expression der mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gene <i>Mstn</i> und <i>Murf1</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	59
Abbildung 4-27: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene <i>Drosha</i> und <i>Dgcr8</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	60
Abbildung 4-28: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene <i>Dicer11</i> und <i>Xpo5</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	61

Abbildung 4-29: Analyse der Expression von miR-1 und miR-107 in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	62
Abbildung 4-30: Analyse der Expression von miR-133a und miR-133b in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	63
Abbildung 4-31: Analyse der Expression von miR-206 und miR-208b in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	64
Abbildung 4-32: Analyse der Expression von miR-20a und miR-20b in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	65
Abbildung 4-33: Analyse der Expression von miR-29a in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining	66
Abbildung 4-34: Gewichtsverlauf der Versuchstiere innerhalb der zehnwöchigen Versuchsdauer	67
Abbildung 4-35: Vergleich des Gewichts der untersuchten Muskeln	68
Abbildung 4-36: Vergleich der Laufleistungen	70
Abbildung 4-37: Schematische Darstellung der Laufleistungen	71
Abbildung 4-38: Analyse der Expression des entzündungsassoziierten Gens <i>Il-6-r</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufradtraining	72
Abbildung 4-39: Analyse der Expression der entzündungsassoziierten Gene <i>Zfp36</i> und <i>Ho1</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufradtraining	73
Abbildung 4-40: Analyse der Expression des mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gens <i>Ucp3</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufradtraining	74
Abbildung 4-41: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene <i>Cox4</i> und <i>Pgc-1α</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufradtraining	75
Abbildung 4-42: Analyse der Expression des für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gens <i>Myh1</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufradtraining	76
Abbildung 4-43: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene <i>Myh2</i> und <i>Myh7</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufradtraining	77
Abbildung 4-44: Analyse der Expression des für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gens <i>Actn3</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufradtraining	78

Abbildung 4-45: Analyse der Expression der mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gene <i>Mstn</i> und <i>Murf1</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	79
Abbildung 6-46: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene <i>Dgcr8</i> und <i>Dicer1</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	80
Abbildung 4-47: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene <i>Drosha</i> und <i>Xpo5</i> auf RNA-Ebene in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	81
Abbildung 4-48: Analyse der Expression von miR-1 in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	82
Abbildung 4-49: Analyse der Expression von miR-107 in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	83
Abbildung 4-50: Analyse der Expression von <i>miR-133a</i> und <i>miR-133b</i> in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	84
Abbildung 4-51: Analyse der Expression von miR-206 in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	85
Abbildung 4-52: Analyse der Expression von miR-208b in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	86
Abbildung 4-53: Analyse der Expression von miR-20a und miR-20b in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	87
Abbildung 4-54: Analyse der Expression von miR-29a in Antwort auf ein zehnwöchiges <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	88
Abbildung 4-55: Analyse der Expression von entzündungsassoziierten Genen in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	90
Abbildung 4-56: Analyse der Expression der mit metabolischen und mitochondrialen Veränderungen assoziierten Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	91
Abbildung 4-57: Analyse der Expression der für Sarkomer-Strukturproteine kodierenden Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	92
Abbildung 4-58: Analyse der Expression der mit Muskelkatabolismus und -umbau assoziierten Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	93
Abbildung 4-59: Analyse der Expression der für die miRNA-Biogenese assoziierten Gene in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen <i>ad libitum</i> -Laufbandtraining	94

Abbildung 4-60: Analyse der Expression verschiedener *miRNA*-Spezies in Antwort auf ein zehnwöchiges Laufbandtraining im Vergleich zu einem zehnwöchigen *ad libitum*-Lauftraining _____95