

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock, Sektion für
Neuroimmunologie, Leiter: Professor Dr. med. Uwe Klaus Zettl
und
dem Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf, Abteilung Signaltransduktion,
Leiter: PD Dr. rer. nat. Andreas Höflich

Effekt eines Laufbandtrainings auf das Transkriptomprofil von Muskelzellen in Mäusen mit hoher Laufleistung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Elli Brosig

geb. am 08.02.1997 in Rostock

Rostock, 2021

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Klaus Zettl, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Mittlmeier, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
3. Gutachter: Prof. Dr. Michael Lalk, Universität Greifswald, Institut für Biochemie

Datum der Einreichung: 21.07.2021

Datum der Verteidigung: 23.08.2022

Für meine Eltern, meine Brüder und für Paul.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung	1
1.1 Physiologie des Skelettmuskels.....	2
1.1.1 Muskelaufbau.....	2
1.1.2 Muskelfasertypen.....	3
1.1.3 Muskelwachstum.....	3
1.2 Muskelkontraktion.....	4
1.3 Energiestoffwechsel der Skelettmuskulatur.....	5
1.4 Mitochondrialer Metabolismus.....	6
1.5 Oxidativer Stress und Muskelaktivität.....	7
1.6 Bedeutung der Genregulation für den Organismus	8
1.7 Genexpressionsanalysen.....	8
1.7.1 Next Generation Sequencing (NGS).....	9
1.7.2 Transkriptomanalyse mittels RNASeq	10
1.8 Das Dummerstorf-Mausmodell	11
2 Ziel- und Fragestellungen	15
3 Material & Methoden.....	17
3.1 Materialien.....	17
3.1.1 Chemikalien.....	17
3.1.2 Kits.....	18
3.1.3 Primer	19
3.1.4 Antikörper.....	22
3.1.5 Geräte	23
3.1.6 Weitere Verbrauchsmaterialien	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Tiere und Haltung.....	24
3.2.2 Laufbandtraining.....	25
3.2.3 Next Generation Sequencing.....	26
3.2.4 Signalweganalyse und Auswahl näher zu untersuchender Gene	28

3.2.5	Herstellung der Proteinlysate	29
3.2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	30
3.2.7	Kapillar-Immunoblot.....	30
3.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	31
3.2.9	Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten.....	32
3.2.10	RNA-Extraktion für die Polymerasekettenreaktion.....	33
3.2.11	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	33
3.2.12	Generierung spezifischer Primer und Primeretablierung	34
3.2.13	Vergleich der Ergebnisse von Next Generation Sequencing und quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion.....	35
3.2.14	Statistische Auswertung.....	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Phänotypische Veränderungen der Skelettmuskulatur	40
4.2	Qualitätskontrolle und Validierung der Genexpressionsdaten	41
4.3	Transkriptionelle Veränderungen im Oberschenkelmuskel (M. rectus femoris).....	44
4.4	Beteiligung differentiell exprimierter Gene an muskulären Signalwegen.....	51
4.5	Regulation der Muskeldifferenzierung	53
4.5.1	Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien.....	53
4.5.2	Unterschiede im Vergleich der Mäuse beider Mauslinien.....	56
4.6	Mitochondrialer Metabolismus.....	63
4.6.1	Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien.....	63
4.6.2	Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien	63
4.7	Komponenten der Abwehr oxidativen Stresses	70
4.7.1	Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien.....	70
4.7.2	Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien	72
5	Diskussion.....	77
5.1	Daten von phänotypischen Veränderungen der Skelettmuskulatur	78
5.2	Transkriptionelle Veränderungen im Oberschenkelmuskel (M. rectus femoris).....	78
5.3	Beteiligung differentiell exprimierter Gene an muskulären Signalwegen.....	80
5.4	Regulation der Muskeldifferenzierung	81
5.4.1	Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien.....	81

5.4.2	Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien	82
5.5	Mitochondrialer Metabolismus.....	86
5.5.1	Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien.....	86
5.5.2	Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien	87
5.6	Oxidativer Stress und Muskularbeit.....	89
5.6.1	Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien.....	89
5.6.2	Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien	90
5.7	Angewandte Methodik	92
6	Zusammenfassung	96
7	Ausblick	98
8	Literaturverzeichnis	100
9	Anhang.....	117
9.1	Tabellenverzeichnis	117
9.2	Abbildungsverzeichnis	118
9.3	Lebenslauf	120
9.4	Supplementäre Dokumente.....	121
9.5	Thesen zur Dissertation	122
9.6	Eidesstattliche Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	125
9.7	Danksagung	126

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
~	ungefähr
<	kleiner als
>	größer als
≅	entspricht
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
A	Absorption
à	je
Abb.	Abbildung
ACAD	Acyl-CoA-Dehydrogenase
ACh	Acetylcholin
ACTN3	alpha-Actinin 3
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-Kinase
ANKRD1	<i>Ankyrin Repeat Domain 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> ; Bicinchoninsäure
BCV	<i>biological coefficient of variation</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration

Abkürzungsverzeichnis

ca.	circa
CAT	Katalase
C _{av}	spannungsabhängiger Calciumkanal
CDK5	<i>cyclin-dependent kinase 5</i> ; Cyclin-abhängige Kinase 5
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre DNA
CK	Kreatin-Kinase
CKM	muskuläre Kreatin-Kinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
C _p	<i>crossing point</i>
cpm	<i>counts per million</i>
CSV	<i>comma-separated values</i>
C _t	<i>cycle threshold</i>
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEG	differentiell exprimiertes Gen
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
Dld	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase
Dlst	Dihydrolipoyl-Transsuccinylase
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
dT	Desoxythymidin
dTTP	Desoxythymintriphosphat
DUC	Dummerstorf-Kontrolllinie
DUhTP	<i>Dummerstorf high Treadmill Performance</i>

Abkürzungsverzeichnis

E	Effizienz
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
EIF2	<i>eukaryotic initiation factor 2</i> ; eukaryotischer Initiationsfaktor
emPCR	Emulsions-Polymerasekettenreaktion
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPSP	erregendes postsynaptisches Potential
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
et al.	und andere
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FNDC5	<i>fibronectin type III domain-containing protein 5</i>
FoxO	Forkhead-Box-Proteine
Fzt:DU	Auszuchtlinie Forschungszentrum Dummerstorf
g	Gramm
GLUT	Glukosetransporter
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GPD	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathionperoxidase
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
GSR	Glutathion-Reduktase
GTP	Guanosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HGP	Humangenomprojekt
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HO·	Hydroxylradikal
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
HTRA2	<i>high temperature requirement protein A2</i>
i.d.R.	in der Regel
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IFC	<i>integrated fluidic circuit</i>
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IGF1R	Insulin-like growth factor 1-Rezeptor
IGFBP	Insulin-like growth factor-Bindungsprotein
IgG	Immunglobulin G
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IPKB	<i>Ingenuity Pathway Knowledge Base</i>
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
IU	<i>International Unit</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basenpaar
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KrP	Kreatinphosphat
LCAD	Langketten-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

LDH	Laktat-Dehydrogenase
LFC	\log_2 (<i>fold change</i>)
\log_2	<i>logarithmus dualis</i>
m	Meter
M.	<i>musculus</i>
Mm.	<i>musculi</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i> ; monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mdh	Malat-Dehydrogenase
MEF	<i>myocyte enhancer factor</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
min	Minute
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
mM	Millimol pro Liter
mmol	Millimol
MRF	<i>myogenic regulatory factor</i> ; Myogenese regulierender Faktor
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mV	Millivolt
MYF5	Myogener Faktor 5
MYMK	<i>Myomaker</i>
Myod1, MYF3	Myogener Faktor 3
n	Anzahl
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NADH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
ncRNA	<i>non-coding ribonucleic acid</i>

Abkürzungsverzeichnis

NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol pro Liter
NOX	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
Ogdh	Oxoglutarat-Dehydrogenase
p	<i>probability</i>
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PFKM	Phosphofruktokinase, <i>muscle type</i>
PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphoinositol-4,5-Biphosphat
PIP3	Phosphoinositol-3,4,5-Triphosphat
piRNA	<i>piwi-interacting ribonucleic acid</i>
PK	Pyruvat-Kinase
PLA	Phospholipase A
PPAR- α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PPAR- δ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor delta</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin</i>
RIN	<i>ribonucleic acid integrity number</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RNASeq	<i>ribonucleic acid- sequencing</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RXR α	<i>retinoid X receptor alpha</i>
RYR1	Ryanodin-Rezeptor 1
s	Sekunde
S.	Seite
SBL	<i>Sequencing-by-Ligation</i>
SBS	<i>Sequencing-by-Synthesis</i>
SDS	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfat</i>
sed	<i>sedentary</i> ; bewegungsarm, ohne Training
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPF	spezifisch pathogenfrei
SPINK1	<i>serine protease inhibitor Kazal-type 1</i>
SREBP-1	<i>sterol regulatory element-binding protein 1</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle

Abkürzungsverzeichnis

TBST	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-buffered saline with Tween20</i>
Tbx1	T-Box-Transkriptionsfaktor 1
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFAM	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TM	<i>treadmill</i> ; Laufband
TVT	Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e. V.
U	Unit
u.a.	unter anderem
UCP	<i>uncoupling protein</i> ; Entkopplungsprotein
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
x g	<i>times gravity</i>
x	mal
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die regelmäßige körperliche Bewegung und gezielte Muskelanspannung zum Zwecke der Leistungssteigerung bzw. -erhaltung wird in der Sportmedizin als „Training“ bezeichnet (Hollmann und Hettinger 1990). Trainingsformen, die dazu dienen, die Ausdauer zu steigern, werden als „Ausdauertraining“ zusammengefasst. Zu diesen gehört auch das Laufbandtraining.

Der Begriff der Ausdauer beschreibt die motorische Fähigkeit, eine bestimmte Belastungsintensität über einen möglichst langen Zeitraum und ohne vorzeitige physische oder psychische Ermüdung aufrechtzuerhalten (Hohmann et al. 2014). Sportarten wie Laufen, Radfahren oder Schwimmen können die Ausdauerleistung fördern und tragen positiv zum Erhalt der Gesundheit bei. Durch die körperliche Bewegung werden alle Organsysteme, darunter Atmungs-, Herz-Kreislauf-, Immun-, muskuloskelettales und auch Verdauungssystem, positiv beeinflusst. Ein aktiver Lebensstil fördert zudem die seelische Ausgeglichenheit, verhindert Gewichtszunahme und Adipositas und verringert das Risiko degenerativer Erkrankungen im Alter. Dem Skelettmuskel, der durch seine kontraktile Eigenschaften eine physische Aktivität erst möglich macht, kann in diesem Zusammenhang eine herausragende Bedeutung zugeschrieben werden (Casuso und Huertas 2020).

Die individuelle Ausdauerleistung ist ein multifaktorielles Merkmal, zu dem sowohl Umweltfaktoren (Training und Ernährung) als auch genetische Faktoren beitragen (Georgiades et al. 2017). Gene und Genvarianten am Menschen und am Tiermodell zu identifizieren, die mit einer herausragenden körperlichen Leistung zusammenhängen, ist bereits seit vielen Jahren Forschungsgegenstand (Ahmetov et al. 2016; Ahmetov und Rogozkin 2009; Al-Khelaifi et al. 2019; Eynon et al. 2011). Die kleine Stichprobengröße und die Komplexität des menschlichen Genoms erschweren jedoch genomweite Untersuchungen (Pitsiladis et al. 2016). Darüber hinaus werden viele Gene gar nicht exprimiert, d.h. in Proteine übersetzt, die im Körper eine bestimmte Funktion ausüben (Tam et al. 2019). Derzeit ist die Untersuchung aller exprimierten Proteine einer Zelle (Proteom) jedoch technisch zu aufwendig und wird insbesondere durch die Dauer der Proteomanalyse limitiert (Slavov 2021). Eine Alternative ist die Transkriptomanalyse, d.h. die Untersuchung der Gesamtheit aller RNA-Moleküle in einer Zelle (Milward et al. 2016). Umfassende Transkriptomanalysen des menschlichen Skelettmuskels hinsichtlich der Ursachen verbesserter Ausdauer wurden bis dato jedoch kaum publiziert (Pillon et al. 2020). Auch am Tiermodell wurden bis jetzt nur wenige Studien diesbezüglich veröffentlicht (Widmann et al. 2019; Zhou et al. 2019).

1.1 Physiologie des Skelettmuskels

Das Muskelgewebe ist eines der vier Grundgewebe des menschlichen Körpers und das größte Organsystem (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Über aktive Verkürzung der kontraktilen Muskelfilamente Aktin und Myosin ist es in der Lage, mechanische Arbeit zu verrichten. Die Abfolge aus Kontraktion und anschließender Relaxation ist nicht nur Voraussetzung für die aktive Fortbewegung eines Organismus, sondern auch wesentlich für die Funktion innerer Organe. Über die Synthese von Myokinen fungiert der Muskel zusätzlich als endokrines Organ (Laurens et al. 2020). Nach dem mikroskopischen Erscheinungsbild unterscheidet man zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur. Zu letzterer zählt auch die Skelettmuskulatur. Da der Fokus dieser Arbeit auf den Besonderheiten des Skelettmuskels liegt, wird sich im weiteren Verlauf auch spezifisch auf diesen konzentriert werden.

1.1.1 Muskelaufbau

Der Skelettmuskel ist über seine Sehne am Knochen befestigt und wird außen meist von einer Faszie aus straffem Bindegewebe sowie einer darunter gelegenen Schicht aus lockerem Bindegewebe umhüllt (*Abb. 1*). Diese Schicht wird auch als Epimysium bezeichnet. Über in den Muskel einstrahlende Bindegewebssepten wird dieser in größere Sekundär- und kleinere Primärbündel unterteilt. Ein Primärbündel besteht aus mehreren Muskelzellen. Bei der einzelnen Skelettmuskelzelle handelt es sich um ein mehrkerniges Synzytium mit den darin befindlichen kontraktilen Myofilamenten (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Die versorgenden Gefäße des Muskels verlaufen in den abgrenzenden Bindegewebsstraßen.

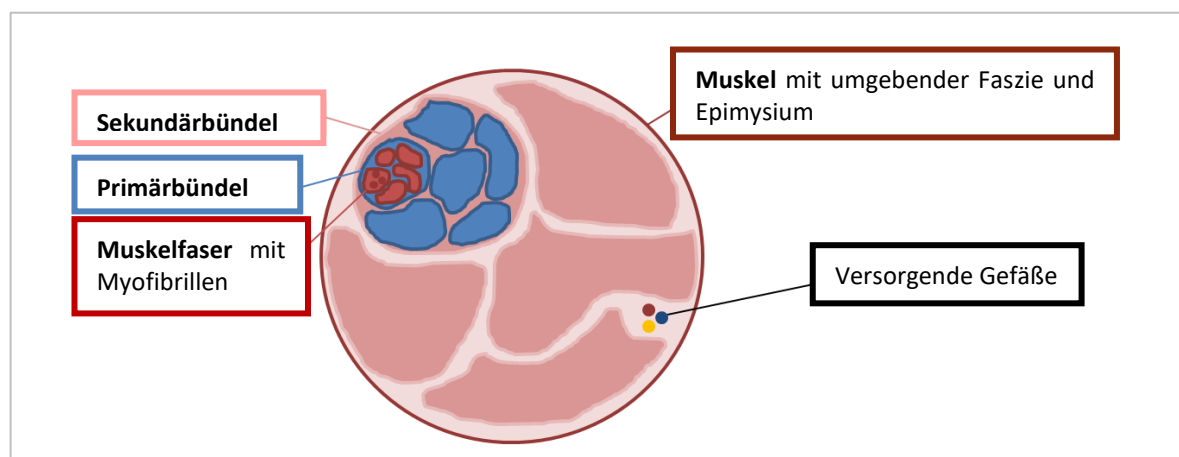


Abb. 1: Modellhafter Skelettmuskelquerschnitt. Der Skelettmuskel wird von einer Muskelfaszie umhüllt und über Bindegewebssepten weiter unterteilt

1.1.2 Muskelfasertypen

Entsprechend den unterschiedlichen Anforderungen an die Skelettmuskulatur findet man verschiedene Typen der Skelettmuskelfasern: ausdauernde und langsam-zuckende (*slow twitch*) Typ-I-Fasern sowie kraftvolle und schnell-zuckende (*fast twitch*) Typ-II-Fasern (Tab. 1) (Gekle 2010). Die Faserart wird im Allgemeinen anhand der spezifischen Isoform der schweren Kette des Myosins bestimmt (Talbot und Maves 2016). Durch gezieltes Training ist es dabei möglich, die einzelnen Muskelfasertypen ineinander umzuwandeln (Gekle 2010).

Tab. 1: Muskelfasertypen im Vergleich

Muskelfasertyp	Typ I	Typ IIA	Typ IIB
Synonyme Bezeichnung	S (<i>slow</i>)	FR (<i>fast, fatigue-resistant</i>)	FF (<i>fast, fast-fatigable</i>)
Zuckungsgeschwindigkeit	langsam	schnell	schnell
Ermüdbarkeit	resistent	resistent	schnell
Stoffwechsel	oxidativ	glykolytisch und oxidativ	glykolytisch
Mitochondrien	viel	viel	wenig
Myosin	MHC-I	MHC-IIa	MHC-IIb (in Nagetiermuskel); MHC-IIx (human)

Es werden Typ I-, Typ IIA- und Typ IIB-Muskelfasern unterschieden, die unterschiedliche morphologische und funktionelle Eigenschaften aufweisen. *MHC: myosin heavy chain*

1.1.3 Muskelwachstum

Durch Training, insbesondere Kraft- aber auch Ausdauertraining, kommt es zu einer anhaltenden Erhöhung des Muskelfaserquerschnitts. Diese Zunahme des Muskelquerschnitts erfolgt i.d.R. durch eine Verdickung bereits bestehender Muskelfasern (Muskelfaserhypertrophie) (Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Diese Verdickung erfordert einen Zugewinn an Kernen, der durch ruhende Myoblasten, die sogenannten Satellitenzellen, ermöglicht wird. Die Satellitenzellen werden u.a. durch trainingsbedingte Mikrotraumata sowie diverse Wachstums- und Transkriptionsfaktoren aktiviert. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören auch die Myogenese regulierenden Faktoren (*Myogenic Regulatory Factors*, MRFs) sowie *Myocyte Enhancer Factors* (MEFs) (Potthoff und Olson 2007). Die Aktivität der MRFs und MEFs unterliegt einer Kontrolle durch den *Insulin-like growth factor 1*-Akt- (IGF1-Akt) Signalweg, der als Effektor von Körper- und Organwachstum gilt (Schiaffino und Mammucari 2011). Ein vereinfachtes Schema des IGF1-Akt-Signalweges ist in Abb. 2 (S. 4) dargestellt:

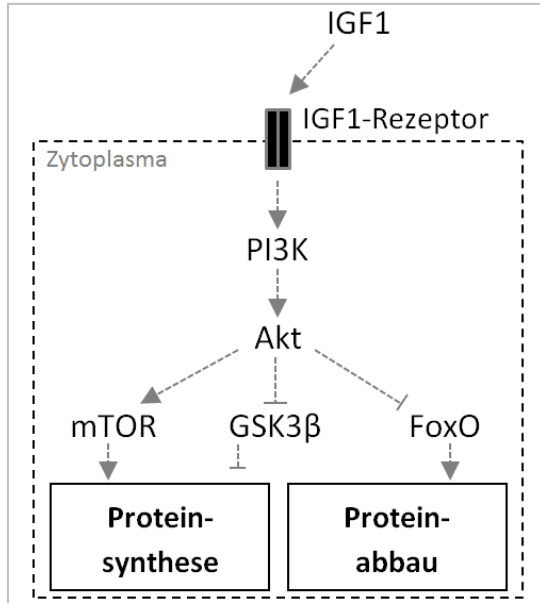


Abb. 2: IGF1-Akt-Signalweg (modifiziert nach Schiaffino und Mammucari 2011). IGF1 kontrolliert Muskelwachstum und Proteinsynthese via mTOR, GSK3 β und FoxO. Ein Pfeil symbolisiert einen aktivierenden, ein Balken einen hemmenden Effekt. *FoxO*: Forkhead-Box-Proteine; *GSK3 β* : Glykogensynthase-Kinase 3 beta; *IGF1*: Insulin-like growth factor 1; *mTOR*: mammalian Target of Rapamycin; *PI3K*: Phosphoinositid-3-Kinase

IGF1 bindet an seinen Rezeptor und bewirkt über Insulin Rezeptor Substrat (IRS) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) die Bildung von Phosphoinositol-3, 4,5-triphosphat (PIP3). PIP3 seinerseits phosphoryliert und aktiviert Akt. Durch Hemmung von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Box-Protein (FoxO)-Familie unterdrückt Akt wiederum den Proteinabbau von Muskelproteinen wie Myosin und stimuliert über Aktivierung des *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) und Hemmung von Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3B) die Synthese von Muskelproteinen und Myofibrillogenese (Schiaffino und Mammucari 2011). Nach ihrer Aktivierung verschmelzen die Satellitenzellen mit der Muskelfaser, stellen die Faserintegrität wieder her und steigern gleichzeitig das muskuläre Hypertrophiepotential (Bazgir et al. 2017).

1.2 Muskelkontraktion

Die Synapse zwischen α -Motoneuron und Skelettmuskelfaser, deren Erregung zu einer Muskelfaser-Einzelzuckung führt, wird als motorische Endplatte bezeichnet. Da ein Motoneuron mehrere Axonterminale besitzt, kann es dementsprechend mehrere Synapsen zu mehreren Muskelfasern ausbilden (Pape et al. 2019).

Ein an der motorischen Endplatte ankommendes Aktionspotential bewirkt eine Freisetzung von Acetylcholin (ACh) in den synaptischen Spalt. Durch Bindung von ACh an nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) entlang der Muskelfaser kommt es zu einer Muskelfaserdepolarisation und Ausbildung eines muskulären Aktionspotentials. Transversal(T)-

Tubuli, Einstülpungen der muskulären Zellmembran (Sarkolemm), leiten das Aktionspotential auch in zellulär tiefer gelegene Abschnitte weiter. Hier wird der elektrische Impuls letzten Endes in chemische Signale umgewandelt, die eine Muskelkontraktion bewirken (Pape et al. 2019). Dieser Prozess wird auch als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Die elektromechanische Kopplung wird ermöglicht über eine Interaktion von Membranrezeptoren mit Rezeptoren entlang des Sarkoplasmatischen Retikulums. Diese hier lokalisierten Rezeptoren werden als Ryanodinrezeptoren (RyR1) bezeichnet und bewirken eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (Pape et al. 2019). Bei Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es unter ATP-Verbrauch zu einem Ineinandergleiten der kontraktiven Muskelfilamente und so zu einer Muskelkontraktion.

Damit die Muskelkontraktion dabei möglichst ökonomisch mit minimalem Energieverbrauch abläuft, muss die vom Skelettmuskel erbrachte Kraft an die jeweiligen Erfordernisse angepasst werden. Die Kontraktionskraft des Muskels hängt dabei im Wesentlichen von drei Faktoren ab. Zu diesen drei Faktoren zählen die Ausgangslänge der Sarkomere, die Anzahl gleichzeitig aktivierter motorischer Einheiten (Rekrutierung) sowie die Aktionspotentialfrequenz des α -Motoneurons, auch Frequenzkodierung genannt (Pape et al. 2019).

1.3 Energiestoffwechsel der Skelettmuskulatur

Voraussetzung für Muskelkontraktion ist chemische Energie in Form des Adenosintriphosphates (ATP). Da der zelluläre Vorrat an ATP jedoch begrenzt ist (ca. 6 mmol/kg Muskel (Keul et al. 1969)) und nur für begrenzt viele Kontraktionen ausreicht, muss durch kontinuierliche Resynthese ein gleichbleibender ATP-Spiegel gewährleistet werden. Diese Resynthese erfolgt durch den Metabolismus von Kohlenhydraten und Fetten (Gekle 2010). Die zur Energiegewinnung beitragenden Stoffwechselprozesse in Abhängigkeit von der Belastungsdauer sind in *Abb. 3 (S. 6)* dargestellt.

Initial, d.h. zu Beginn der Muskelarbeit, wird die Energie für die ATP-Resynthese anaerob über die Spaltung von Kreatinphosphat sowie die anaerobe Glykolyse bereitgestellt (Gekle 2010; Raschka und Ruf 2018). Bei länger andauernden Leistungen, die ein Limit von ca. 20 min überschreiten, ist jedoch zwingend aerobe Energiebereitstellung nötig. Hierbei erfolgt die Energiegewinnung über Citratzyklus und Atmungskette, ist also direkt abhängig von der Mitochondriendichte sowie einer ausreichenden Zufuhr von Nährstoffen (Fettsäuren, Glukose) und O_2 . Zunächst wird dabei das Muskelglykogen abgebaut und im Anschluss wird auf die Blutglukose zurückgegriffen. Um eine Hypoglykämie zu verhindern wird nun das Leberglykogen abgebaut und schließlich über hepatische Glukoneogenese Glukose neu synthetisiert. Bei voller Leistung reichen die Glykogenspeicher in Leber und Muskel für 60-90 min (Gekle 2010). Mit länger andauernder Belastung erfolgt der Energiegewinn zunehmend auch über die Oxidation von Fettsäuren.

Insgesamt liefern also vier verschiedene Stoffwechselprozesse, nämlich die Hydrolyse von Kreatinphosphat, die anaerobe Glykolyse, die Oxidation von Kohlenhydraten sowie die Oxidation von Fettsäuren, die Energie für die ATP-Resynthese.

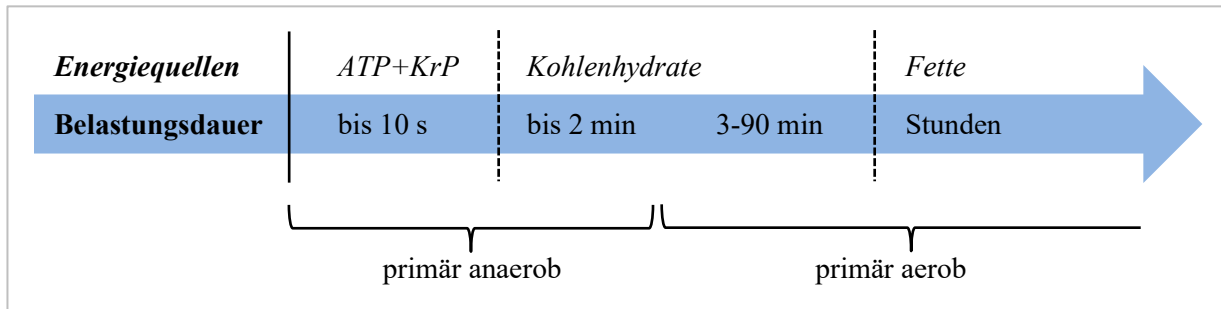


Abb. 3: Energieliefernde Systeme nach Belastungsdauer. Die Übergänge zwischen den einzelnen Systemen sind fließend (modifiziert nach Raschka und Ruf 2018). *ATP: Adenosintri-phosphat; KrP: Kreatinphosphat*

1.4 Mitochondrialer Metabolismus

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien als „Kraftwerke der Zelle“ ist die Produktion des Energieträgers ATP. Die an der ATP-Produktion beteiligten zentralen Stoffwechselwege sind der Citratzyklus sowie die anschließende Atmungskette (Mookerjee et al. 2017). Die entscheidende Aufgabe des Citratzyklus besteht darin, Acetyl-CoA in einem Kreisprozess zu CO_2 , NADH/H^+ , FADH_2 und GTP abzubauen. Die Elektronen der entstehenden Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 werden anschließend über eine Abfolge von Redoxsystemen der Atmungskette weitergeleitet und liefern Energie für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (Oxidative Phosphorylierung). Auch die β -Oxidation als ein Reduktionsäquivalente liefernder Prozess findet in den Mitochondrien statt (Horn 2019).

Da außerhalb der Mitochondrien erzeugte Reduktionsäquivalente nicht in der Lage sind, die innere Mitochondrienmembran zu überwinden, sind spezielle Shuttlesysteme erforderlich. Dazu zählen der Malat-Aspartat- sowie der α -Glycerophosphat-Shuttle (Heinrich et al. 2014). Die solchermaßen importierten Reduktionsäquivalente können dann ebenfalls im Zuge der Atmungskette verstoffwechselt werden. Eine Verstoffwechslung von Reduktionsäquivalenten ohne Energiegewinn wird durch spezifische Protonenkanäle in der inneren Mitochondrienmembran ermöglicht. Hierbei handelt es sich um sogenannte Entkopplungsproteine (UCP1, 2 und 3), die u.a. der zitterfreien Thermogenese dienen und an zellulären Redox-regulierten Signalwegen beteiligt sind (Cadenas 2018; Demine et al. 2019). Neben ihrer zentralen Rolle im Stoffwechsel erfüllen Mitochondrien weitere Funktionen wie beispielsweise die Speicherung von Calciumionen oder die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Heinrich et al. 2014).

1.5 Oxidativer Stress und Muskelaktivität

Jede sportliche Belastung, insbesondere aber jede intensive und jede ausdauersportliche Belastung, geht mit einer Erhöhung des Energieverbrauchs einher. Nicht nur im Muskel, sondern im gesamten Körper werden dann vermehrt oxidative Prozesse initiiert, um den gestiegenen Energiebedarf zu decken (*Kap. 1.3*). Bei einer vollständig ablaufenden mitochondrialen Oxidation von Kohlenhydraten und Fetten entstehen dann die unschädlichen Abbauprodukte Kohlenstoffdioxid und Wasser. Diese Reaktionen laufen jedoch zu einem geringen Prozentsatz (1 - 5 %) nicht vollständig ab (Wei et al. 2001). Es entstehen aggressive Sauerstoffverbindungen, sogenannte ROS (Incalza et al. 2018). Dabei handelt es sich um reaktionsfreudige, instabile Sauerstoff- und Sauerstoff-Wasserstoffverbindungen wie beispielsweise Superoxid (O_2^-) und Hydroxylradikale ($HO\cdot$) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Burton und Jauniaux 2011). Neben den Mitochondrien zählen auch die NADPH-Oxidasen (NOXs), Phospholipase A2 (PLA2), Xanthinoxidase (XO) und Lipoxygenasen zu den ROS-Produzenten (Burton und Jauniaux 2011).

Die Bildung dieser freien Radikale ist grundsätzlich ein normaler biologischer Prozess, der eine physiologische Funktion im Organismus erfüllt: Makrophagen und aktivierte Neutrophile nutzen deren zellzerstörendes Potenzial als Abwehrmechanismus, um beispielsweise Bakterien unschädlich zu machen oder Immunprozesse zu modulieren (Mix et al. 1999). Darüber hinaus stimulieren freie Radikale die Expression verschiedener Gene, wie die des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein O3 (FoxO3), der für die Produktion antioxidativer Schutzmechanismen zuständig ist (Kops et al. 2002). Zusätzlich können freie Radikale nicht mehr funktionierende, körpereigene Zellen unschädlich machen, bevor diese entarten oder sich unkontrolliert vermehren (Stangel et al. 2001).

Körpereigene Enzyme und Schutzmechanismen sorgen dafür, dass freie Radikale dort, wo sie nicht gebraucht werden, unschädlich gemacht werden. Dazu zählen das Glutathionsystem, die Glutathionperoxidase (GPX), die Katalase (CAT) sowie die Superoxiddismutasen (SODs) 1 (zytosolisch), 2 (mitochondrial) und 3 (extrazellulär) (Alscher et al. 2002; Benhar 2020). Das Problem ist, dass diese Schutzmechanismen begrenzt sind und mit dem Alter abnehmen. Auch kann eine übermäßige Bildung freier Radikale durch Erkrankungen, einen ungesunden Lebensstil (Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum etc.) und Umwelteinflüsse provoziert werden. Von oxidativem Stress spricht man dann, wenn mehr freie Radikale gebildet werden als der Körper neutralisieren kann. Als die gegenüber diesen Radikalen empfindlichsten Ziele gelten Proteine, Lipide und die DNA (Benhar 2020). Oxidativer Stress wird heute als ein wesentlicher Faktor vorzeitiger Erkrankungs- und Alterungsprozesse angesehen (Sies 2015; Wang et al. 2021).

Wird im Zuge eines Ausdauertrainings also vermehrt Sauerstoff verbrannt, entstehen unweigerlich vermehrt freie Radikale. Insbesondere bei ungewohnten, intensiven Belastungen sind die

antioxidativen Mechanismen einer solchen Belastung nicht gewachsen. Dieser Umstand mündet in vermehrtem oxidativem Stress für den gesamten Organismus. Regelmäßiges Training hingegen kann die antioxidative Reservekapazität des Organismus erhöhen. Es wurde bereits gezeigt, dass insbesondere Organe mit einem hohen Energieumsatz, wie Muskel, Herz und Leber, auf ein regelmäßiges Training mit einer Erhöhung der Aktivität antioxidativer Enzymsysteme reagieren (Radak et al. 2001). Damit kann der Organismus die sportbedingt erhöhte Radikalbildung nicht nur während der Belastung kompensieren. Er besitzt dann außerhalb der akuten Belastungsphasen eine erhöhte Stressresistenz.

1.6 Bedeutung der Genregulation für den Organismus

Damit ein Organismus adäquat auf externe und interne Stimuli, beispielsweise in Form eines veränderten Nährstoffangebotes, veränderter Anforderungen oder hormoneller Reize, reagieren kann, existieren spezifische Adaptionsmechanismen, die eine vermehrte oder verminderte Expression von Genen und Genprodukten ermöglichen. Dieser Prozess wird Genregulation genannt und ist Inhalt verschiedener Forschungen. Die Genregulation ermöglicht im eukaryoten Organismus die Entstehung verschiedener Zelltypen mit unterschiedlichen Genexpressionsmustern. Es wird so nicht das gesamte Genom exprimiert, sondern nur diejenigen Gene, die für den jeweiligen Zelltyp benötigt werden. Auf diese Weise entstehen Zellen, die, obwohl mit dem gleichen genetischen Code versehen, unterschiedliche morphologische und funktionelle Merkmale besitzen (Heinrich et al. 2014).

Eukaryotische Gene unterliegen einer individuellen Regulation. Sie werden entweder konstitutiv, als sogenannte „Haushaltsgene“ abgelesen oder aber gezielt reguliert. Die Regulation erfolgt dabei u.a. über spezifische DNA-Abschnitte und DNA-bindende Transkriptionsfaktoren (Heinrich et al. 2014). Grundsätzlich kann jeder Schritt der Genexpression reguliert werden, begonnen bei der Transkription bis hin zur posttranslationalen Modifikation des Proteins. Die Regulation erfolgt dabei beispielsweise über Histonmodifikation, DNA-Methylierung, das Binden von als Repressoren oder Aktivatoren fungierenden Transkriptionsfaktoren, oder alternatives Spleißen (Yilmaz und Grotewold 2010). Zusätzlich regulieren nichtkodierende RNA-Moleküle die Genexpression spezifisch auf post-transkriptionaler Ebene (Fernandes et al. 2019; Thamilarsan et al. 2012).

1.7 Genexpressionsanalysen

Erstmals ermöglicht wurde die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge der DNA, die sogenannte DNA-Sequenzierung, durch die Bemühungen Maxam und Gilberts (Maxam und Gilbert 1977) sowie Sangers im Jahre 1977 (Sanger et al. 1977). Das mit der Zielstellung das menschliche Genom zu entschlüsseln gegründete *Human Genome Project* zeigte jedoch rasch die Grenzen der

Sanger-Methode auf und ließ den Wunsch nach einer schnelleren, günstigeren und zugleich genaueren Sequenzierungsmethode laut werden: Mit der klassischen Sanger-Methode hätte es bei einem Umsatz von ca. 115 kb/Tag knapp 60 Jahre gedauert, das komplette humane Genom zu entschlüsseln (Hert et al. 2008; Mardis 2011). Gefördert durch das *National Human Genome Research Institute* wurde ab 2004 vermehrt an der Entwicklung neuer und günstiger Hochdurchsatz-Verfahren gearbeitet (Mardis 2006). Die ab da entwickelten unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden werden lose unter dem Begriff „*Next Generation Sequencing* (NGS)“ zusammengefasst.

1.7.1 Next Generation Sequencing (NGS)

Dem NGS liegen wie der Sanger-Methode primär die gleichen Mechanismen zugrunde. Durch Anlagerung fluoreszenzmarkierter Nukleotide an einen zu sequenzierenden DNA-Einzelstrang wird die Basenabfolge des Matrizenstrangs entschlüsselt. Die Anlagerung erfolgt dabei mithilfe einer DNA-Polymerase. Auch wenn die einzelnen NGS-Methoden sich im Detail voneinander unterscheiden, ist der grundsätzliche Ablauf ähnlich:

Zunächst muss eine Sequenzierungsbibliothek aus den zu sequenzierenden Matrizen erstellt werden. Dafür werden die aus der Probe gewonnenen Nukleinsäuren (i.d.R. DNA oder aus RNA generierte cDNA) fragmentiert, je nach Methode gröbenselektiert und mit einem Plattformspezifischen Adapter verbunden (Linnarsson 2010). Dabei handelt es sich um synthetisch generierte DNA-Fragmente, die als Primer für die anschließenden Amplifikations- und/ oder Sequenzierungsschritte dienen. Je nach verwendeter NGS-Plattform werden die so gewonnenen DNA-Fragmente anschließend entweder direkt sequenziert („*single-molecule templates*“) oder zur Erhöhung der Signalstärke klonal amplifiziert („*clonally amplified templates*“) (Mardis 2011). Ist eine Amplifikation der aus der Probe gewonnenen Nukleinsäuren erforderlich, erfolgt auch diese je nach Methode auf unterschiedliche Weise: Während bei der Emulsions-PCR (emPCR) die Vervielfältigung an in einer Flüssigkeit befindlichen „*microbeads*“ erfolgt (z.B. bei der Ion-Torrent-Sequenzierung), erfolgt sie bei der Illumina-Sequenzierung gebunden an eine Trägerplatte unter Ausbildung von zum Matrizenstrang komplementären DNA-Brücken („*solid-phase bridge amplification*“). Die Daten der vorliegenden Arbeit basierten auf den Methoden der Illumina-Sequenzierung. Je nach Plattform existieren darüber hinaus noch weitere Amplifikationsmethoden (Rizzo und Buck 2012).

Der, wenn nötig durchgeführten, Amplifikation schließt sich die eigentliche Sequenzierung an. Je nach Plattform wird auch hier erneut zwischen zwei verschiedenen Methoden, dem Prinzip des *Sequencing-by-Synthesis* (SBS) und dem des *Sequencing-by-Ligation* (SBL), unterschieden (Goodwin et al. 2016). Während bei SBS fluoreszenzmarkierte Einzelnukleotide DNA-Polymerase-abhängig an den Matrizenstrang angelagert werden, erfolgt die Anlagerung der

Nukleotide bei SBL in Form fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide. Je nachdem, welches Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von den angelagerten Nukleotiden detektiert wird, kann daraus auf die Basensequenz der Matrize geschlossen werden.

Mit sinkenden Kosten der NGS-Technologien finden diese nun langsam Zugang zum klinischen Alltag: Während bis 2013 zur Abklärung genetisch bedingter Erkrankungen nur die Sanger-Methode zur Verfügung stand, erfolgt eine humangenetische Diagnostik heute zunehmend über NGS-Methoden (Bolz und Hoischen 2019). Diese erlauben es, gleichzeitig viele hundert Gene parallel zu lesen, um genetische Veränderungen zu erkennen. Da für viele erbliche Krankheiten, z.B. neuromuskuläre Erkrankungen, nicht nur ein spezifisches Gen als Auslöser in Frage kommt, können Diagnosen durch NGS deutlich schneller gestellt werden (Kamps et al. 2017). Mit einer gezielten und teilweise lebenswichtigen Therapie kann so deutlich schneller begonnen werden. Zusätzlich genügt i.d.R. bereits eine Blutprobe von nur 2-3 ml, um die für die Analyse benötigte DNA zu gewinnen (Kamps et al. 2017). Weitere belastende Untersuchungen wie etwa Muskelbiopsien sind für die DNA-Analytik nicht mehr nötig. Nichtsdestotrotz sind die Methoden des NGS weiterhin mit einem erheblichen Zeit- und Geldaufwand verbunden und setzen ein umfangreiches Know-how hinsichtlich Speicherung, Interpretation und Verarbeitung der sequenzierten Daten voraus (Bolz und Hoischen 2019).

1.7.2 Transkriptomanalyse mittels RNASeq

Die Transkriptomanalyse dient dazu, die Gesamtheit aller Transkripte einer Zelle oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt oder unter bestimmten Bedingungen zu erfassen. Klassische Methoden wie Northern Blot, Microarrays und quantitative *Reverse Transcription* PCR (qRT-PCR) ermöglichen es, mithilfe spezifischer Primer oder Sonden das Transkriptomprofil bekannter Gene oder Genabschnitte zu erfassen. Anhand des Vergleiches mehrerer Proben miteinander können Expressionsunterschiede detektiert werden (Segundo-Val und Sanz-Lozano 2016).

Eine Möglichkeit, das Transkriptom ohne genaue Kenntnis der zu betrachtenden Sequenz zu untersuchen, bietet die in der vorliegenden Arbeit angewandte „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“ oder RNASeq (Zhao et al. 2014). Diese zwar kostenaufwändige, dafür jedoch sensitive Methode, basiert auf den Methoden des NGS und erfordert nur geringe Mengen an RNA (Giraldez et al. 2018; Morin et al. 2008). Neben der Quantifizierung der Genexpression zum aktuellen Zeitpunkt dient die RNASeq auch der Entdeckung neuer Transkripte, der Identifikation alternativer Spleißprodukte und der Untersuchung Allel-spezifischer Genexpression. Je nach betrachteter RNA-Subfamilie können Aussagen zur Expression diverser RNA-Spezies getroffen werden (Kukurba und Montgomery 2015).

1.8 Das Dummerstorf-Mausmodell

Das Leibniz-Institut für Nutztierbiologie entwickelt seit den 1970er Jahren weltweit einzigartige Mausmodelle. Dabei handelt es sich um nicht-angezüchtete Langzeitspektionslinien, die durch selektive Züchtung, nicht aber durch genetische Manipulation auf verschiedene phänotypische Merkmale etabliert wurden (*Quelle: <https://www.fbn-dummerstorf.de/institute/institut-fuer-genetik-und-biometrie/abteilungen-und-gruppen/servicegruppe-modelltierlaboratorium/>*). Die eigentliche Ursprungslinie aller Selektionslinien ist die Auszuchtlinie Fzt:DU, welche durch systematische Kreuzung von 4 Inzucht- und 4 Auszucht-Mauslinien in den frühen 1970er Jahren entstand (Falkenberg et al. 2000). Ausgehend von diesem polygenen Gründerpool wurde dann unter anderem ab 1982 die Linie DUhTP („*Dummerstorf high Treadmill Performance*“) entwickelt (Dietl et al. 2004) (*Abb. 4; S. 12*). Die auch als „Marathonmaus“ bekannte Linie wurde über 140 Mausgenerationen auf hohe Laufleistung selektiert. Dafür wurden 70 Tage alte männliche Mäuse nach der Anpaarung auf einen singulären Ausdauerlauf auf einem Computer-gestützten Laufband getestet. Die Nachkommen der besten Läufer wurden für die Zucht der nächsten Marathonmausgeneration ausgewählt (Falkenberg et al. 2000). Da die Tiere der Linie Fzt:DU nie zuvor trainiert wurden, entspricht die geleistete Laufstrecke primär der genetisch fixierten Leistung. Für die Generierung der Vergleichsgruppe der DUC-Kontrollmäuse wurden die Tiere randomisiert und unter Vermeidung von Inzucht verpaart. Aufgrund der langjährigen Selektion auf Ausdauerleistung unter Vermeidung der Inzucht eignen sich DUhTP-Marathonmäuse besonders für die unvoreingenommene Untersuchung der dem Energiestoffwechsel zugrundeliegenden Genexpression.

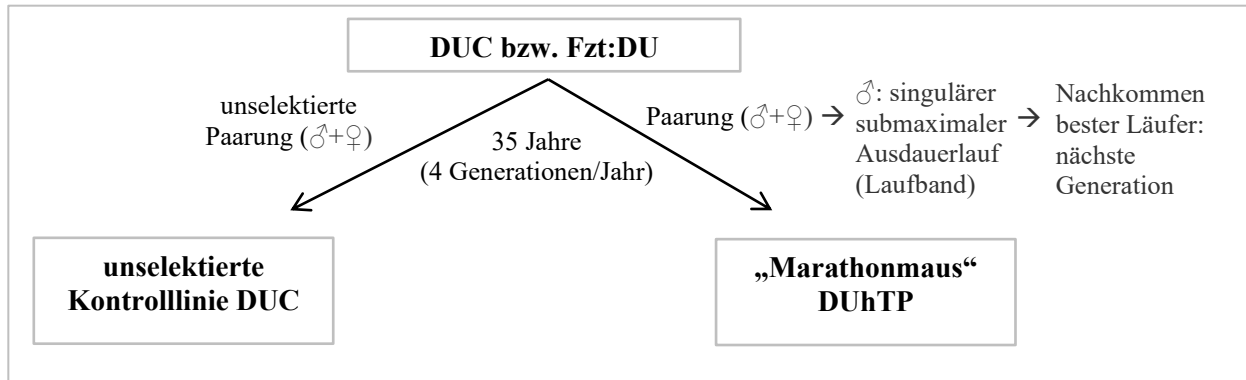


Abb. 4: Selektion auf hohe Laufbandleistung in Dummerstorf. Durch Verpaarung von Individuen der Ursprungs-Mauslinie Fzt:DU entstanden über einen Zeitraum von 35 Jahren hinweg die Mauslinie DUhTP (=Marathonmaus) sowie die Kontrolllinie DUC. Männliche Individuen, die eine herausragende Leistung auf einem singulären Ausdauerlauf auf dem Laufband absolvierten, wurden dabei für die Zucht der nächsten Marathonmaus-Generation DUhTP verwendet. *DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance*

Nach 35 Jahren Selektion legen DUhTP-Marathonmäuse im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen ohne vorangegangenes Training etwa vierfach höhere Entfernungen auf dem Laufband zurück (Brenmoehl et al. 2013). Zusätzlich weisen die DUhTP-Marathonmäuse bereits in jungen Jahren eine erhöhte Fetteinlagerung sowie erhöhte Konzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterol in Blut und Leber in Ruhe auf (Tab. 2; S. 14). Ein einziger submaximaler Lauf bewirkt jedoch bereits eine Normalisierung der Hyperlipidämie in DUhTP-Marathonmäusen (Brenmoehl et al. 2013). Gibt man den Marathonmäusen die Möglichkeit, sich freiwillig zu bewegen, so unterscheidet sich das Laufverhalten bzw. die zurückgelegte Strecke nicht von dem der Kontrolltiere. Allerdings lagern die Marathonmäuse mit zunehmendem Alter weniger Fettdepots an und verlieren zusätzlich bereits akkumuliertes Fett. Marathonmäuse sind somit in der Lage, akkumuliertes Körperfett als Energielieferant während physischer Aktivität effizient zu nutzen und bessere Ausdauerleistung auf dem Laufband abzurufen (Brenmoehl et al. 2015).

Diese effizientere Umschaltung zwischen Fettanlagerung in Ruhe und Fettmobilisierung unter Belastung ist eine direkte Folge der langen Selektion und stellt eine von vielen Adaptionen im Bereich des Stoffwechsels in der Marathonmaus dar. Transkriptomanalysen in der Leber von Marathonmäusen belegten etwa eine signifikante Induktion der Glukoneogenese sowie der Fettsäure- und Cholesterinbiosynthese im Vergleich zur unselektierten Kontrolle (Brenmoehl et al. 2013; Ohde et al. 2016). So konnten in der Leber von DUhTP-Marathonmäusen erhöhte mRNA-Level von *Peroxisome proliferator-activated receptor delta* (Ppar- δ) und *Sterol regulatory element-binding protein 1* (Srebp-1) sowie eine vermehrte Proteinexpression von Sirtuin-1, Acetyl-CoA-Synthetase, Acetyl-CoA-Carboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Glutamat-

Dehydrogenase nachgewiesen werden, die mit einer erhöhten Serumkonzentration von Progesteron korrelierten (Brenmoehl et al. 2013; Ohde et al. 2016).

Brenmoehl et al. wiesen im Subkutanfett selektionsbedingte Anpassungen der metabolischen Kapazität nach (Brenmoehl et al. 2015; Brenmoehl et al. 2017). Ohne Einfluss von Bewegung oder einem anderen Stressor waren in den Marathonmäusen höhere Expressionslevel von Lipidstoffwechsel-relevanten Faktoren zu beobachten (Brenmoehl et al. 2015; Brenmoehl et al. 2017). Bei leichter körperlicher Aktivität im Laufrad für 3 Wochen wurde eine Expressionserhöhung von Enzymen der Fettsäurehydrolyse (hormonsensitive Lipase) und -oxidation (Langketten-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (LCAD)) sowie von *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) beobachtet (Brenmoehl et al. 2015; Brenmoehl et al. 2017). Körperliche Aktivität bewirkte darüber hinaus bei DUhTP-Marathonmäusen, nicht jedoch bei der Kontrolllinie, eine Expressionserhöhung des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (Tfam) im Subkutanfett (Brenmoehl et al. 2015). Dementsprechend wurde in der DUhTP-Marathonmaus eine höhere mitochondriale Masse, selbst nach leichter körperlicher Arbeit, diskutiert. Diese Hypothese wurde 2017 bestätigt, als gezeigt wurde, dass DUhTP-Marathonmäuse einen höheren Irisinspiegel und verschiedene Marker für die Bräunung der Fettzellen, wie den T-Box-Transkriptionsfaktor (Tbx1), *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (Ppar- α) und das Entkopplungsprotein 1 (Ucp1), aufweisen (Brenmoehl et al. 2017). Ein moderates Training stimulierte die Ucp1-Expression in der DUhTP-Marathonmauslinie zusätzlich (Brenmoehl et al. 2017). Mit einer vermehrten Expression von Ucp1 in DUhTP-Marathonmäusen verbunden war auch eine signifikant erhöhte Oberflächentemperatur im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen (Brenmoehl et al. 2017). Ein niedrigerer Blutzuckerspiegel nach einem oralen Glukosetoleranztest in der DUhTP-Marathonmauslinie zeigte zusätzlich, dass die DUhTP-Marathonmäuse eine bessere metabolische Gesundheit als die DUC-Kontrollmäuse aufwiesen (Brenmoehl et al. 2017). Es wurde geschlussfolgert, dass in der DUhTP-Marathonmauslinie ohne weitere äußere Einflüsse, aber als Folge der Selektion, mitochondriale Biogenese und damit einhergehend auch die Fettzellbräunung erhöht sind. Die vermehrte Fettzellbräunung konnte auch auf phänotypischer Ebene bestätigt werden (Brenmoehl et al. 2017).

Das Skelettmuskelgewebe der Marathonmaus hingegen wurde bis dato noch kaum untersucht. Abgesehen von einer bereits gezeigten Expressionserhöhung des Myokins Irisin sowie von PGC-1 α -mRNA im Muskel der Marathonmaus gegenüber DUC-Kontrollmäusen (Brenmoehl et al. 2014) sind spezifische muskuläre Mechanismen, die für die verbesserte Ausdauer verantwortlich sein könnten, noch ungeklärt. Derzeit wird darüber hinaus von den gleichen Mäusen auch das Hirngewebe mit NGS analysiert. Der aktuelle Wissensstand bezüglich der DUhTP-Marathonmäuse kann Tab. 2 (S. 14) entnommen werden.

Einleitung

Insbesondere für Sport- und Rehabilitationsmedizin, aber auch aus evolutioneller Sicht ist die Übertragung der aus dem Mausmodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen von besonderem Interesse: Das Modell eröffnet so die Möglichkeit, Prozesse, die am Menschen als - im Vergleich zur Maus - deutlich langlebigerem Organismus nur schwer abzubilden sind, mit verhältnismäßig geringem Aufwand darzustellen. Eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen bietet sowohl für die Präventions- und Rehabilitationsmedizin als auch für die Sportmedizin die Möglichkeit, die Ursachen verbesserter Ausdauer auf Ebene des Muskeltranskriptoms aufzufindig zu machen und zu klären, ob die Ausdauerleistung des Menschen genetisch fixiert ist. Die Möglichkeit, ein Gen zu finden, das mit einer verbesserten Ausdauer assoziiert ist, ist hierbei von besonderem Interesse. Genau hier bietet sich somit ein Ansatz für weitere Nachforschungen und die Möglichkeit, die Auswirkungen von Ausdauertraining sowie die Ursachen gesteigerter Ausdauer besser zu verstehen.

Tab. 2: Aktueller Kenntnisstand zu physiologischen und molekularen Besonderheiten der DUhTP-Marathonmauslinie

Allgemein	<ul style="list-style-type: none"> - Ausdauer ↑ - Fetteinlagerung in Ruhe ↑ - Fettmobilisierung bei Belastung ↑
Leber	<ul style="list-style-type: none"> - PPAR-δ ↑, SREBP-1 ↑, Sirtuin-1 ↑ - Glukoneogenese ↑ - Fettsäurebiosynthese ↑ - Cholesterinbiosynthese ↑
Subkutanfett	<ul style="list-style-type: none"> - PPAR-α ↑, PGC-1α ↑, Tfam ↑, Irisin ↑, Tbx1 ↑, Ucp1 ↑ - Mitochondriale Biogenese ↑ - Fettzellbräunung ↑ - Fettsäureabbau bei Belastung ↑
Skelettmuskel	<ul style="list-style-type: none"> - Irisin ↑ - PGC-1α-mRNA durch Belastung ↑

Bereits untersucht wurden Leber- und subkutanes Fettgewebe sowie der Skelettmuskel in Ansätzen. Die Ergebnisse sind jeweils im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen angegeben. ↑: vermehrte Expression gegenüber den DUC-Kontrollmäusen (vgl. Brenmoehl et al. 2013; Brenmoehl et al. 2014; Brenmoehl et al. 2015; Brenmoehl et al. 2017; Ohde et al. 2016; Abkürzungen s. Verzeichnis ab S. I)

2 Ziel- und Fragestellungen

Ziel der Arbeit war es einerseits, Veränderungen aufzuzeigen, die ein Laufbandtraining auf transkriptioneller Ebene im Muskel bewirkt. Andererseits sollte geklärt werden, welche Unterschiede im Muskeltranskriptom einen besonders ausdauernden Muskel charakterisieren.

Dazu haben wir folgende Fragenkomplexe generiert:

- Wie unterscheiden sich Körpergewicht und Oberschenkelmuskelmass zwischen den untersuchten Mäusen?
 - Gibt es Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten Mäusen beider Linien?
 - Haben DUhTP-Mäuse unabhängig vom Training eine signifikant verschiedene Körper- bzw. Muskelmasse als DUC-Mäuse?
- Sind die RNASeq-Daten der verschiedenen Mäuse vergleichbar und valide?
 - Gibt es Ausreißer in den Muskel-Transkriptomprofilen?
 - Lassen sich die mit RNASeq gemessenen Expressionsunterschiede in qPCR-Analysen für eine Auswahl von Genen bestätigen?
- Welche Auswirkungen hat ein Ausdauertraining auf die Genexpression des Muskels?
 - Wie viele Gene sind je nach Mauslinie signifikant verschieden exprimiert in der Gruppe der trainierten Mäuse im Vergleich zur Gruppe der untrainierten Mäuse?
 - Wie viele Gene sind sowohl in DUhTP- als auch in DUC-Mäusen in trainierten Individuen im Vergleich zu untrainierten Individuen signifikant verschieden exprimiert?
 - An welchen Signalwegen und biologischen Prozessen partizipieren die Gene mit differentieller Expression?
 - Ist Laufbandtraining mit Unterschieden in der Expression von Genen, die für die Muskeldifferenzierung, den mitochondrialen Metabolismus und die Abwehr oxidativen Stresses eine Rolle spielen, assoziiert?
 - Spiegeln sich die Genexpressionsunterschiede auf Proteinebene wider?
- Welche Eigenschaften des Muskeltranskriptoms machen einen Organismus besonders ausdauernd?
 - Wie viele Gene sind im Vergleich von DUhTP- und DUC-Mäusen unabhängig vom Laufbandtraining (konsistent) signifikant differentiell exprimiert?
 - An welchen Signalwegen und biologischen Prozesse sind die differentiell exprimierten Gene beteiligt?

Ziel- und Fragestellungen

- Wie unterscheidet sich die muskuläre RNA- bzw. Protein-Expression von Genen, die Muskeldifferenzierung, mitochondrialen Metabolismus und antioxidative Mechanismen regulieren, in DUhTP-Mäusen im Vergleich zu DUC-Mäusen?

3 Material & Methoden

Das Studiendesign der vorliegenden Arbeit kann *Abb. 5* entnommen werden. Die für die Analysen benötigten Materialien und Methoden sind im weiteren Verlauf dieses Kapitels aufgeführt.

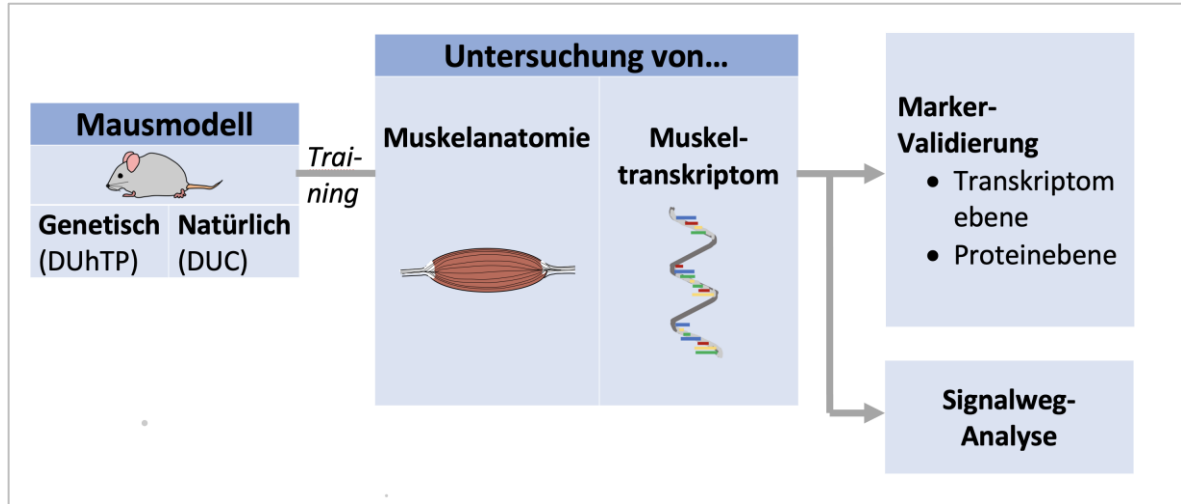


Abb. 5: Studiendesign. Die Oberschenkelmuskeln (M.rectus femoris) von auf Ausdauerleistung selektierten DUhTP-Marathonmäusen und unselektierten DUC-Kontrollmäusen wurden hinsichtlich anatomischer und transkriptioneller Merkmale untersucht und miteinander verglichen. Differenziell exprimierte Gene wurden auf Transkriptom- und Proteinebene validiert und einer computerbasierten Signalweg-Analyse unterzogen.

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Für die vorliegende Arbeit wurden, aufgeführt in alphabetischer Reihenfolge, folgende Chemikalien verwendet (*Tab. 3*):

Tab. 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm® CA, USA
2X Assay Loading Reagent	Fluidigm®, CA, USA
5X Wash Buffer	ProteinSimple, CA, USA
Antibody Diluent 2	ProteinSimple, CA, USA
Anti-Rabbit Secondary Antibody	ProteinSimple, CA, USA
Baseline Zero DNase (1U/µl)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Baseline Zero Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA

Material & Methoden

Cell Lysis Buffer (10X)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
Complete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Exonuclease I (20 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
GoScript™ 5X Reaction Buffer	Promega Corporation, WI, USA
GoScript™ Reverse Transcriptase	Promega Corporation, WI, USA
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega Corporation, WI, USA
LP Control Line Fluid 48.48	Fluidigm®, CA, USA
Luminol-S	ProteinSimple, CA, USA
MgCl ₂ (25mM)	Promega Corporation, WI, USA
Nuclease-Free Water	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
Oligo(dT)15 Primer	Promega Corporation, WI, USA
PCR Nucleotide Mix	Promega Corporation, WI, USA
Peroxide	ProteinSimple, CA, USA
Random Primers	Promega Corporation, WI, USA
Recombinant RNasin ® Ribonuclease Inhibitor	Promega Corporation, WI, USA
RNasin PLUS	Promega Corporation, WI, USA
Streptavidin-HRP	ProteinSimple, CA, USA
TaqMan™ PreAmp Master Mix	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Thermo Scientific™ Molecular BioProducts™ RNase™ AWAY	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.1.2 Kits

Folgende Kits, aufgeführt in alphabetischer Reihenfolge, kamen zum Einsatz (*Tab. 4*):

Tab. 4: Kits

Kits	Hersteller
Anti-Rabbit Detection Module for Jess, Wes, Peggy Sue or Sally Sue	ProteinSimple, CA, USA
BCA Protein Assay Macro Kit	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega Corporation, WI, USA
Nucleospin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

RNA Clean & Concentrator-25	Zymo Research, CA, USA
-----------------------------	------------------------

3.1.3 Primer

Die Primer für die PCR wurden auf Grundlage von Literaturrecherchen und mittels PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) (Wang et al. 2012) ausgewählt und von Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, bezogen. Alle verwendeten Primer sind in *Tab. 5* aufgeführt. Die Oligonukleotid-Pellets wurden in TE (TRIS-EDTA; 10mM TRIS; 1mM EDTA; pH 7,75)-Puffer-Lösung für die Erstellung einer 0,1 mM Stocklösung gelöst und über Nacht kühl gestellt. Für die weitere Verwendung wurden die entsprechenden Primersets (*reverse* (R) und *forward* (F)-Primer) mit nukleasefreiem Wasser (Promega, Maddison, WI, USA) zu einer Arbeitslösung mit je 20 µM verdünnt.

Tab. 5: Primer

Gensymbol	Ensembl Gen-ID	Primer-Sequenzen (5'→3')
<i>Actb</i>	ENSMUSG00000029580	F_TGACAGGATGCAGAAGGAGA R_CGCTCAGGAGGAGCAATG
<i>Ankr1</i>	ENSMUSG00000024803	F_GCTGGTAACAGGCAAAAAGAAC R_CCTCTCGCAGTTTCTCGCT
<i>Atf3</i>	ENSMUSG00000026628	F_GAGGATTTTGCTAACCTGACACC R_TTGACGGTAACTGACTCCAGC
<i>Ceacam2</i>	ENSMUSG00000054385	F_AGACCGTCAAGCCACATC R_CGCTGAGAGGTTGTCATCTT
<i>Chrna1</i>	ENSMUSG00000027107	F_CTCTCGACTGTTCTCCTGCTG R_GTAGACCCACGGTGACTTGTA
<i>Fndc5</i>	ENSMUSG00000001334	F_TTGCCATCTCTCAGCAGAAGA R_GGCCTGCACATGGACGATA
<i>Foxo3</i>	ENSMUSG00000048756	F_GCAAGCCGTGTACTGTGGA R_CGGGAGCGGATGTTATCC
<i>Gabra3</i>	ENSMUSG00000031343	F_CTCTCTGCTTCGGGGAAGTG R_CTTGGCTAGTGGTTCCAGGG
<i>Gpx8</i>	ENSMUSG00000021760	F_CCTTTCGCTGCCTACCCATTA R_GAGTAGAAGCTGTTGGTTCTCG
<i>Hif1a</i>	ENSMUSG00000021109	F_ACCTTCATCGAAACTCCAAG R_ACTGTTAGGCTCAGGTGAACT
<i>Hprt1</i>	ENSMUSG00000025630	F_TCCTCCTCAGACCGCTTTT R_CCTGGTTCATCATCGCTAATC
<i>Igf1</i>	ENSMUSG00000020053	F_GTGAGCCAAAGACACACCCA R_ACCTCTGATTTCCGAGTTGC
<i>Igf2bp2</i>	ENSMUSG00000033581	F_GCGGGTACCTGTGAAAAGAG R_CCTCAGAGTGGTCGTCATCA
<i>Il6ra</i>	ENSMUSG00000027947	F_CCTGAGACTCAAGCAGAAATGG R_AGAAGGAAGGTCGGCTTCAGT
<i>Inca1</i>	ENSMUSG00000057054	F_ATGCCTCAGCCGTATGGAGAT R_GCCCTCAGAATTGGTGGAATGTA

Material & Methoden

<i>Kcnk1</i>	ENSMUSG00000033998	F _GGGAAATTGGAATTGGGACTTCA R _GCCGATGACAGAGTAGATGAT
<i>Lepr</i>	ENSMUSG00000057722	F _GTGTCTACTGCTCAATGACG R _TGAAATTAACAGTGTTCCGTTTGA
<i>Mettl21c</i>	ENSMUSG00000047343	F _ACTCTCGGGGACTCCACAG R _GCTCTTGTGTGTAGCTGGCATA
<i>Mmp9</i>	ENSMUSG00000017737	F _TTGGTTTCTGCCCTAGTGAGAGA R _AAAGATGAACGGGAACACACAGG
<i>Mstn</i>	ENSMUSG00000026100	F _AGTGGATCTAAATGAGGGCAGT R _GTTTCCAGGCGCAGCTTAC
<i>Mup1</i>	ENSMUSG00000089873	F _CTCTATGGCCGAGAACCAGA R _GGAAGGGATGATGGTGGAG
<i>Myc</i>	ENSMUSG00000022346	F _AGAGCTCCTCGAGCTGTTTG R _GGCTGTACGGAGTCGTAGTC
<i>Mymk</i>	ENSMUSG00000009214	F _TTCTCCCCGACAGTGAGCAT R _GCACAGCACAGACAAACCAG
<i>Myog</i>	ENSMUSG00000026459	F _AGTGAATGCAACTCCACA R _CTGGGAAGGCAACAGACATA
<i>Per2</i>	ENSMUSG00000055866	F _CAGAGGAGAAGACTCCGCAC R _TTGCTGTCTGCTGGATGATGT
<i>Pgk1</i>	ENSMUSG00000062070	F _CAGTCTAGAGCTCCTGGAAGGT R _AGGAGCACAGGAACCAAAGG
<i>Plkm2</i>	ENSMUSG00000032294	F _TTACCAGCGACCCACAGAA R _TCACGGCAATGATAGGAGCC
<i>Plekhh1</i>	ENSMUSG00000060716	F _TTGGGAAACTGATGGATGGTG R _GGCAAGGTGGTAAGGGAGG
<i>Ppara</i>	ENSMUSG00000022383	F _AGAGGGCACACGCTAGGAAG R _CCCAAAACAGCTGCGAACAC
<i>Ppargc1a</i>	ENSMUSG00000029167	F _CTCGATGAGTGTGTGCTGTG R _GGAAGATCTGGCAAAGAGG
<i>Ppargc1b</i>	ENSMUSG00000033871	F _TCCTGTAAAAGCCCGAGTAT R _GCTCTGGTAGGGCAGTGA
<i>Pten</i>	ENSMUSG00000013663	F _TGGATTGACTTAGACTTGACCT R _GCGGTGTCATAATGTCTCTCAG
<i>Rab27b</i>	ENSMUSG00000024511	F _TGGCTGAAAAATATGGCATACCA R _CCAGAAGCGTTTCCACTGACT
<i>Rabep2</i>	ENSMUSG00000030727	F _CACGGATCTCCTCTCAGAGCA R _CTGGGACAGCCGTACAAAGTC
<i>Rpl26</i>	ENSMUSG00000060938	F _GAACCGCAAACGGCATTTC R _TAGTGTCCGGAACAACCTG
<i>Rplp2</i>	ENSMUSG00000025508	F _GACGATGATCGGCTCAACAAG R _ACCCTGAGCGATGACATCCT
<i>Rps2-ps13</i>	ENSMUSG00000081684	F _GTGCTCCAAGGAGGTTGCT R _GGGCTTGCCAACTTTGTTCC
<i>Sirt2</i>	ENSMUSG00000015149	F _GCCTGGGTTCCCAAAGGAG R _GAGCGGAAGTCAGGGATACC
<i>Sirt3</i>	ENSMUSG00000025486	F _ATCCCGACTTCAGATCCCC R _CAACATGAAAAAGGGCTTGGG

Material & Methoden

<i>Sirt5</i>	ENSMUSG00000054021	F _CTCCGGGCCGATTCATTTCC R _GCGTTCGCAAACACTTCCG
<i>Slc2a1</i>	ENSMUSG00000028645	F _CAGTTCGGCTATAACACTGGTG R _GCCCCGACAGAGAAGATG
<i>Slc2a4</i>	ENSMUSG00000018566	F _GTGACTGGAACACTGGTCCTA R _CCAGCCACGTTGCATTGTAG
<i>Tgfb1</i>	ENSMUSG00000002603	F _CTCCCGTGGCTTCTAGTGC R _GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
<i>Tgfb2</i>	ENSMUSG00000039239	F _TCGACATGGATCAGTTTATGCG R _CCCTGGTACTGTTGTAGATGGA
<i>Trim5</i>	ENSMUSG00000060441	F _AAGAGGTCACAGAGGCTCAAC R _CACACTCGTGTATAAGATTACTTGC
<i>Ube2c</i>	ENSMUSG00000001403	F _GCAGAGTGCCTGCTAATC R _CTGGAAGTCGGATCTCGGT

(*F*_forward; *R*_reverse)

3.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden, aufgeführt in alphabetischer Reihenfolge, für die Validierung verwendet (Tab. 6):

Tab. 6. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Akt Antikörper #9272 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
AMPKα1/2 Antikörper (H-300): sc-25792 (Kaninchen-IgG)	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
ERβ Antikörper (H-150): sc-8974 (Kaninchen-IgG)	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Glut1 Antikörper (H-43): sc-7903	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
Glut4 Antikörper (H-61): sc-7938	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA
GSK-3β (27C10) Kaninchen mAb	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
IGF-I Rezeptor β (111A9) Antikörper #3018 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
Mono-biotinyl Human IGF-II (Receptor Grade)	GroPep Bioreagents, Thebarton, Australien
p38 MAPK Antikörper #9212 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Antikörper #4695 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
Phospho-Akt (Ser 473) Antikörper #9271 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
Phospho-AMPKα (Thr172) (40H9) Antikörper #2535 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP [®] Antikörper #4511 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP [®] Antikörper #4370 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
Phospho-PTEN (Ser380) Antikörper #9551 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
PTEN (D4.3) XP [®] Antikörper #9188 (Kaninchen-IgG)	Cell Signaling Technology (CST), MA, USA
RelA/NFκB p65 Antikörper (NB100-56712SS)	Novus Biologicals, CO, USA
Anti- SREBP1 Antikörper (ab28481)	Abcam, Cambridge, UK

3.1.5 Geräte

Folgende Geräte kamen zum Einsatz (Tab. 7):

Tab. 7: Geräte

Geräte	Hersteller
Biomark™ HD	Fluidigm®, CA, USA
Biometra Trio Thermoblock Biotron, Heated Lid	Biometra GmbH- Analytik Jena AG, Göttingen, Deutschland
Eppendorf 5417R Refrigerated Centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
LightCycler® 480	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA
Molecular Devices Spectramax 250 Microplate Reader	Marshall Scientific, Hampton, NH, USA
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Regelbarer Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Rotilabo®-Zentrifuge mit Butterfly-Rotor	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ROTINA 420 Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Techne® digital Dri-Block® DB-2A	Techne®, Staffordshire, UK
Veterinär-Laufband / für Tierversuche / für Mäuse / für Ratten	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Wes™	ProteinSimple, CA, USA

3.1.6 Weitere Verbrauchsmaterialien

Folgende weitere Verbrauchsmaterialien wurden verwendet (Tab. 8):

Tab. 8: Weitere Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
12-230 kDa Jess or Wes Separation Module, 8 x 25 capillary cartridges	ProteinSimple, CA, USA
48x48 Array; LP 48.48 IFC	Fluidigm®, CA, USA
Anti Rabbit Detection Module for Jess, Wes, Peggy Sue or Sally Sue	ProteinSimple, CA, USA
Fluorescent 5x Master Mix	ProteinSimple, CA, USA
Pierce™ 96-Well Polystyrene Plates, Corner Notch	Thermo Fisher Scientific, MA, USA

Sterican Kanüle 0,45x25 mm Gr. 18 braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterican Kanüle 0,90x40 mm Gr. 1 gelb	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

3.2 Methoden

Die Grundlage dieser Arbeit bildeten die Genexpressionsdaten des murinen M. rectus femoris, die mittels NGS gewonnen wurden. Die verwendeten Gewebeproben stammten von Mäusen der Instituts-eigenen Zuchtlinien (Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf, Deutschland). Die NGS-Genexpressionsdaten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. N. Trakooljul, FBN Dummerstorf, in Form von Rohdaten zur Verfügung gestellt.

Für die vorliegende Arbeit wurden diese Genexpressionsdaten mittels eines Analyseprogrammes Signalweganalysen unterzogen. Im RNASeq-Experiment als differentiell exprimiert identifizierte Gene wurden zusätzlich auf RNA- und Proteinebene validiert. Mit dem Hintergrund der in *Kap. 2* aufgeführten Fragen erfolgte eine Interpretation der NGS-Daten sowie der eigenständig experimentell gewonnenen Ergebnisse. Eine vereinfachte Darstellung der in dieser Arbeit erfolgten Arbeitsschritte ist in *Abb. 6* dargestellt.

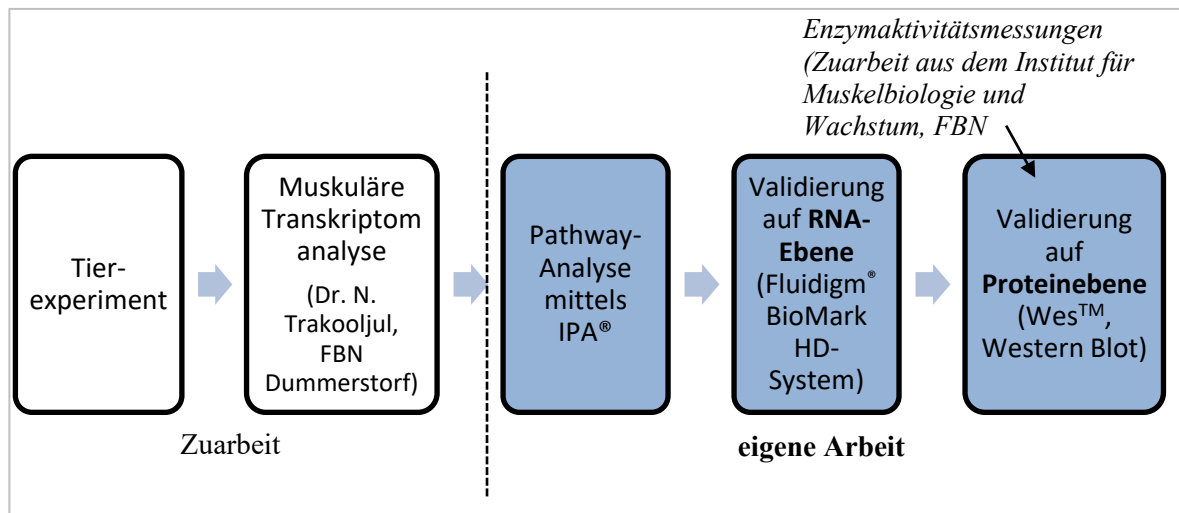


Abb. 6: Workflow der vorliegenden Arbeit. Die Genexpressionsdaten des M. rectus femoris wurden mit Hilfe der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) einer Signalweganalyse unterzogen und anschließend auf RNA- und Proteinebene validiert. Die gestrichelte Linie dient der Unterscheidung von mittels Zuarbeit und mittels eigenständiger Arbeit (in blau dargestellt) gewonnenen Daten. Der zeitliche Ablauf der Arbeit wird durch die Pfeile verdeutlicht.

3.2.1 Tiere und Haltung

Die Tiere entstammen den Instituts-eigenen Zuchtlinien. Alle *in-vivo* Versuche und Haltungsbedingungen im Modelltierlaboratorium des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie

entsprechen den Anforderungen des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV). Die Tiere wurden in einem spezifisch pathogenfreien (SPF) Haltungssystem mit definiertem Hygienestandard gehalten. Auch das Laufbandtraining erfolgte unter diesen Bedingungen. Hygienemanagement und Gesundheitsüberwachung in der SPF-Haltung erfolgten unter Berücksichtigung der Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) (Mahler Convenor et al. 2014). Die Tiere wurden in Polysulfon-Käfigen Eurostandard Typ II (267 × 207 × 140 mm; Tecniplast, Germany) gehalten. Die Umweltbedingungen wurden durch einen 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus definiert (Raumtemperatur 22,5 ± 0,2 °C) und ständiger Luftwechsel wurde gewährleistet. Zusätzlich bestand freier Zugang zu Trinkwasser und Futter. Die Käfigbesatzdichte entsprach den gesetzlichen Vorgaben der europäischen Versuchstierverordnung (Richtlinie 2010/63/EU). Die männlichen Individuen, die für den Versuch herangezogen wurden, wurden ab dem 21. Lebenstag in Einzelkäfigen gehalten (Empfehlung nach GV-Solas). Planung und Durchführung des gesamten Versuches erfolgten nach den Empfehlungen der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e. V. (TVT) durch geschultes Personal.

3.2.2 Laufbandtraining

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Männchen beider Mauslinien, DUhTP-Marathonmaus (n=16) und DUC-Kontrollmaus (n=16), in je zwei Gruppen unterteilt. Jeweils eine Gruppe (n=8) wurde in regulärer Einzel-Käfighaltung gehalten („*sedentary; sed*“), während die Tiere der anderen Gruppe (n=8) zusätzlich zur Einzelhaltung noch drei Wochen lang einen täglichen Lauf auf einem computergestützten Laufband („*treadmill; TM*“) absolvierten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg). Es entstanden so insgesamt vier Gruppen:

DUhTP_TM: männlich; 49.-70. Lebenstag; mit Laufbandtraining (n=8)

DUhTP_sed: männlich; 49.-70. Lebenstag; ohne Laufbandtraining (n=8)

DUC_TM: männlich; 49.-70. Lebenstag; mit Laufbandtraining (n=8)

DUC_sed: männlich; 49.-70. Lebenstag; ohne Laufbandtraining (n=8)

Das Laufbandtraining begann ab dem 49. Lebenstag und orientierte sich an den individuellen Laufleistungen beider Mauslinien: Da die durchschnittliche submaximale Laufzeit der DUhTP-Marathonmäuse in der letzten Testung der Laufleistung bei 2 h 13 min lag und damit ein 30-minütiger Lauf etwa 22,56 % der submaximalen Leistung entsprach, wurde die Laufdauer der

DUC-Kontrollmäuse bei einer durchschnittlichen submaximalen Leistung von nur 1 h 6 min entsprechend auf 15 min angepasst. Das Training sah nach einem ersten Trainingstag auf dem Laufband eine zweitägige Pause vor. Danach erfolgte ein regelmäßiges Training (5x/Woche) mit zunehmender Laufbandgeschwindigkeit (Abb. 7).

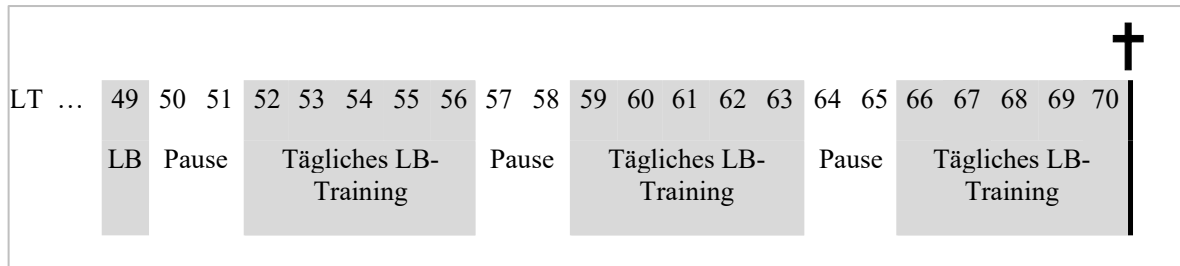


Abb. 7: Ablauf des Trainingsversuches. Sowohl Individuen der DUhTP-Marathonmauslinie als auch der DUC-Kontrollmäuse absolvierten ein dreiwöchiges Laufbandtraining. Das Training wurde den Leistungen der Tiere angepasst und erfolgte mit steigender Geschwindigkeit. †: Dekapitation; LB: Laufband; LT: Lebenstag

Jedes Trainingsprogramm begann mit einer Anfangsgeschwindigkeit von 0,2 m/s gefolgt von einer minimalen Steigerung der Anfangsgeschwindigkeit auf 0,25, 0,33 und 0,36 m/s für 160 s in den 3 nachfolgenden Wochen. Die Endgeschwindigkeit für 700 s (DUC-Kontrollmäuse) bzw. 1600 s (DUhTP-Marathonmäuse) steigerte sich ebenfalls wochenweise von 0,25 auf 0,33, 0,42 bzw. 0,5 m/s. Das entsprach nach einem Lauf von 30 min einer Finalstrecke von ca. 830 m. Bei den DUC-Kontrollmäusen konnte die Finalgeschwindigkeit von 0,5 m/s nicht erreicht werden, sodass bei ihnen in der dritten Trainingswoche die Geschwindigkeit der Vorwoche beibehalten blieb (0,42 m/s).

Nach dem Versuch wurden alle Tiere (mit/ohne Training) an Lebenstag 70 gewogen und anschließend ohne visuellen und akustischen Kontakt zu ihren Geschwistern dekapitiert. Den Körpern wurden beidseits der zu untersuchende M. rectus femoris und M. soleus entnommen, gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur anschließenden Analyse gelagert.

3.2.3 Next Generation Sequencing

Die RNA-Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Nares Trakooljul, FBN Dummerstorf, durchgeführt. Die für die RNA-Sequenzierung benötigten Gewebeproben des M. rectus femoris wurden den Mäusen nach Exitus entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert. Insgesamt wurde das Transkriptom von Muskelproben von 16 DUhTP-Marathonmäusen (8 mit, 8 ohne Training) und 16 DUC-Kontrollmäusen (8 mit, 8 ohne Training) sequenziert und die daraus gewonnenen Daten für die vorliegende Arbeit verwendet.

In den anschließenden Analysen identifizierten wir anhand des Vergleichs der RNA-Expressionsprofile Genexpressionsunterschiede in der untrainierten DUhTP-Marathonmauslinie und der Linie der untrainierten DUC-Kontrollmäuse (DUhTP_sed vs DUC_sed). Spontane Anpassungsvorgänge an körperliche Aktivität untersuchten wir in den Vergleichen DUhTP_TM vs sed (für die DUhTP-Marathonmäuse) und DUC_TM vs sed (für die DUC-Kontrollmäuse). Zusätzlich erfolgte ein unmittelbarer Vergleich beider trainierter Linien (DUhTP_TM vs DUC_TM). Expressionsunterschiede, die sowohl im Vergleich DUhTP_sed vs DUC_sed als auch im Vergleich DUhTP_TM vs DUC_TM auftraten, werteten wir als Ergebnis der Ausdauerselektion („selektionsbedingt“). In beiden Vergleichen DUC_TM vs sed und DUhTP_TM vs sed aufgetretene Expressionsunterschiede wurden als „trainingsbedingte Veränderungen“ gewertet.

Die Isolation der RNA und die anschließende Sequenzierung erfolgte wie bereits von Murani et al. an hepatischem Gewebe beschrieben (Murani et al. 2019): Die Gesamt-RNA der Muskelproben wurde mittels der Tri-Reagent-Methode (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) isoliert und anschließend einer DNase-Behandlung sowie einer Säulen-basierten Aufreinigung unterzogen (Nucleospin RNA II Kit, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Wir bewerteten die RNA-Qualität mit dem Agilent RNA 6000 Nano-Kit und dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). Die Konzentration der isolierten RNA lag dabei in einem Bereich von 5-500 ng/µl. Es wurden ausschließlich Proben mit einer RNA-Integritätszahl (RIN) > 8 (Schroeder et al. 2006) zur Erstellung einer cDNA-Bibliothek gemäß dem TruSeq Stranded mRNA-Protokoll (Illumina, San Diego, CA, USA) verwendet. Aus je 2 µg Gesamt-RNA wurden polyadenylierte mRNA-Moleküle unter Verwendung von oligo (dT)-beschichteten magnetischen *beads* angereichert und unter erhöhten Temperaturbedingungen chemisch fragmentiert. Die fragmentierte RNA wurde dann unter Verwendung von Hexameren und Superscript II Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert und mit TruSeq RNA-Adaptoren, die einen einzigartigen DNA-Sequenzierungsindex enthalten, ligiert, um ein Multiplexing zu ermöglichen. Mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) und dem Agilent DNA-1000 Chip-Kit wurden die DNA-Bibliotheken auf die größenabhängige Verteilung der Fragmente überprüft.

Die Konzentrationen der DNA-Bibliotheken wurden mit dem KAPA qPCR Library Quantification Kit (Roche Molecular Systems, Inc.) quantifiziert. Die DNA-Bibliotheken mit 0,5 % eingespikter PhiX-Kontrolle wurden mit dem cBot-System (Illumina, San Diego, CA, USA) klonal geclustert und unter Verwendung des *high-output*-Modus auf dem HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) in der Sequenzieranlage des Instituts für Genombiologie, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Dummerstorf, Deutschland, für 2 x 101 bp sequenziert.

Eine Vorverarbeitung und Qualitätsbewertung der Rohdaten der RNA-Sequenzierung erfolgte mit FastQC (Version 0.11.5) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), indem

Lesevorgänge niedriger Qualität mit einem mittleren Q-Score < 30 und einer Leselänge von weniger als 30bp herausgefiltert und adapterähnliche Sequenzen getrimmt wurden. Die *paired-end reads* wurden dann mit Hilfe von HISAT2 Version 2.1.0 (Kim et al. 2015; Pertea et al. 2016) dem Ensembl-Referenzgenom der Maus (GRCm38) zugeordnet. Mit Hilfe von HTSeq Version 0.8.0 wurde die jedem Gen zugehörige Anzahl der *reads* aus den HISAT2-Kartierungsergebnissen entnommen. Um signifikant unterschiedlich exprimierte Gene (DEGs) zu identifizieren, erfolgte anschließend eine Analyse mit Hilfe von *edgeR* und R-Abhängigkeitspaketen (Robinson et al. 2010). Wir filterten Gene mit geringen Lesewerten (*counts per million*, cpm) heraus, um nur Gene mit $> 0,5$ cpm in mindestens 4 Bibliotheken zu erhalten. Die *edgeR*-Standardparameter wurden mit der Option *trimmed mean of M-values* (TMM) unter Berücksichtigung von Bibliotheksgröße und *composition bias* und der drei Funktionen *estimateGLMCommonDisp*, *estimateGLMTrendedDisp* und *GLMTagwiseDisp* zur Schätzung der interbibliothekarischen Variation angewendet (Marcon et al. 2019; Robinson et al. 2010). *glmFit*- und *glmLRT*-Funktionen, die in *edgeR* implementiert sind, wurden für statistische Tests von DEGs verwendet.

3.2.4 Signalweganalyse und Auswahl näher zu untersuchender Gene

Die mittels NGS identifizierten DEGs für jeden der 4 Vergleiche (von je 2 Mausgruppen zu $n=8$) importierten wir anschließend unter Einbeziehung von *Ensembl Gene_ID*, *Expr Log Ratio*, *Expr p-value* und *Expr False Discovery Rate* in die Ingenuity Pathway Analysis (IPA)-Software (Qiagen, Version 49932394). Die in der Software enthaltene Funktion „*core analysis*“ verwendeten wir, um die unterschiedlich exprimierten Gene funktionell zu interpretieren. Dazu gehörte die Identifizierung der mit den DEGs assoziierten biologischen Prozesse, *Canonical Pathways*, vorgeschalteten Transkriptionsregulatoren und Gen-Netzwerke. Jeder *gene identifier* wurde zu seinem korrespondierenden Geneintrag in der IPA-*knowledge base* (IPKB) gemappt. Wir verwendeten die Standardeinstellungen des Programms, um den Aktivierungszustand von *Canonical Pathways* und vorgeschalteten Regulatoren mit Hilfe der in der Software integrierten IPA-Wissensbasis darzustellen (<https://digitalinsights.qiagen.com/>). Um zu gering ausgeprägte Expressionsunterschiede im Vorfeld der IPA-Analysen herauszufiltern, setzten wir $FDR < 0,05$ sowie $FC \geq 2$ als Cutoffs. Für die Signalweganalysen mit IPA verwendeten wir nur Gene, die innerhalb dieses definierten Bereiches lagen. Die grafische Darstellung der *Canonical Pathways* erfolgte über die Auswahl der Programmfunktion *View Pathway*. Über *View Report* war es möglich, eine Zusammenfassung des gezeigten Signalweges mit seinen Hauptfunktionen zu erhalten. Die Signalwege und ihre mit Hilfe der IPA-Wissensbasis erhaltenen Hauptfunktionen überprüften wir mittels Literaturrecherche auf Assoziationen zu Skelettmuskel und Ausdauer. Dazu suchten wir in der PubMed-Datenbank (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit Hilfe der Schlagwörter „*muscle*“, „*endurance*“ und „*exercise*“ in Verbindung mit dem jeweiligen Signalweg

und seiner Hauptfunktion nach entsprechenden Publikationen. Anhand der so erfolgten Literatursuche wählten wir Gene für die anschließende Validierung mit qPCR sowie die nähere Untersuchung mittels NGS-Datensatz einerseits und der IPA-Funktion „*upstream regulators*“ andererseits aus.

Das Ziel der IPA-Funktion „*upstream regulators*“ ist es, Transkriptionsregulatoren zu identifizieren, die die beobachteten Genexpressionsunterschiede im vorliegenden NGS-Datensatz erklären können. Die Analyse basiert auf dem in der IPKB gespeicherten Vorwissen über erwartete Effekte zwischen Transkriptionsregulatoren und ihren Zielmolekülen. Um festzustellen, welcher der Transkriptionsregulatoren der für die betrachteten Zielmoleküle relevanteste ist, werden die Änderungsrichtungen der Zielmoleküle (d.h. die Expression in der untersuchten Probe relativ zur Kontrolle) untersucht. Stimmen die Änderungsrichtungen der untersuchten Zielmoleküle größtenteils mit dem Aktivierungszustand des vermuteten Transkriptionsregulators überein, wird eine Vorhersage über alle diesem Transkriptionsregulator zugeordneten Zielmoleküle gemacht. Der Zusammenhang zwischen dem solchermaßen ermittelten Transkriptionsregulator und seinen vermuteten Zielmolekülen wird dann in Form einer Grafik dargestellt. Je nachdem, ob die Änderungsrichtungen der Zielmoleküle innerhalb des gesetzten Cutoffs (s.o.) liegen oder nicht, werden diese als „messbar“ oder „vermutet aktiviert/gehemmt“ angegeben.

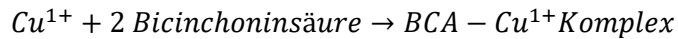
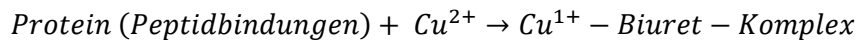
3.2.5 Herstellung der Proteinlysate

Je 0,65 g der bei -80 °C gelagerten Gewebeproben des M. rectus femoris überführten wir in mit 1x CST *Cell-Lysis*-Puffer (Cell Signalling) sowie Keramikkügelchen gefüllte Kryoröhrchen und zerkleinerten diese mechanisch in der Precellys (6000 U/min für 2x 30 s). Danach ließen wir das Zelllysate für 20 min auf Eis inkubieren und verdünnten es anschließend 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer (farblos). Im Anschluss wurden die Proben denaturiert (94 °C, 10 min), zentrifugiert (14000 U/min, 2 min) und der gewonnene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die getrennte Analyse membranöser und zytosolisch lokalisierter Glukosetransporter unterzogen wir die Muskelproben nach mechanischer Homogenisierung in der Precellys einer seriellen Zentrifugation. Diese erlaubte eine Auftrennung der Zellkomponenten auf Grundlage ihrer Größe und Dichte: Durch initiale Zentrifugation bei kleiner Umdrehungszahl (600xg für 10 min, 10000xg für 5 min) erfolgte ein Ausfällen schwerer kompakter Zellkerne, Mitochondrien und Gewebereste. Der verbleibende Überstand wurde im Anschluss bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert (21000xg für 10 min), um Membranfragmente von zytosolischen Proteinen im Überstand zu trennen. Den Überstand überführten wir in ein neues Reaktionsgefäß und lösten das ausgefallte Pellet erneut in 1x CST. Die Lysate wurden dann im Verhältnis 1:10 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinquantifizierung der einzelnen Proteinlysate (jeweils 16 pro Mauslinie á 8 pro Gruppe) erfolgte mittels Bicinchoninsäure (Bicinchoninic acid, BCA, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Das Assay-Kit beinhaltet Puffer-, BCA- und Kupfersulfat-Lösung sowie einen Proteinstandard BSA mit $c=2000 \mu\text{g/ml}$ (SERVA Albumin bovine fraction V, Protease free). Bei der Quantifizierung handelt es sich um eine Kombination aus der Biuret- und einer Komplexbildungsreaktion mit BCA (Smith et al. 1985). Nach Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) in alkalischer Lösung und anschließender Chelatbildung mit BCA kann der entstandene Komplex spektralphotometrisch analysiert werden. Die Menge an reduzierten Cu(I)-Ionen ist dabei proportional zu der in der Probenlösung vorliegenden Proteinmenge X.

BCA-Proteinreaktion (Serva Electrophoresis GmbH):



(Absorptionsmaximum bei 562nm)

Anhand der Erstellung einer Kalibrierungskurve $A_{562 \text{ nm}} = f(c_{\text{BSA}})$ aus unterschiedlichen Verdünnungen einer BSA-Stocklösung mit bereits bekannter Proteinkonzentration können die Proteinmengen der Proben (X in μg) ermittelt werden. Zur Konzentrationsbestimmung C wird anschließend durch das eingesetzte Probenvolumen (V in μl) dividiert. Da die Proteinlysate zuvor im Verhältnis 1:10 vorverdünnt wurden, musste zusätzlich der Verdünnungsfaktor (VF) berücksichtigt werden:

$$(X [\mu\text{g}] / V [\mu\text{l}]) \cdot \text{VF} = C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = C [\text{mg/ml}]$$

Die Erstellung der Kalibrierungskurve sowie die Extrapolation der Konzentration C erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 8.4.1). Um für weitere Analyseschritte eine einheitliche Proteinkonzentration aller Proben aufweisen zu können, wurden diese mittels 1x Laemmli-Puffer auf eine Konzentration von $c=1000 \mu\text{g/ml}$ verdünnt.

3.2.7 Kapillar-Immunoblot

Zur größenbasierten Auftrennung und Analyse der Proteinlysate verwendeten wir das 12-230 kDa Separation Module im WesTM Simple Western System (ProteinSimple, CA) gemäß den Herstelleranweisungen.. Die Skelettmuskelpollen verdünnten wir mittels 1x Laemmli-Puffer auf eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bzw. $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, vermischten diese mit dem *Fluorescent Master Mix* und erhitzen sie für 5 min auf $94 \text{ }^\circ\text{C}$. Anschließend wurden die Proben, Blockingreagenz (*Antibody Diluent*), Primärantikörper (in *Antibody Diluent*; Kap. 3.1), HRP-konjugierter Sekundärantikörper

(*Anti-Rabbit Detection Module*) und Chemilumineszenz-Substrat auf eine 25er Well-Platte aufgetragen. Wir verwendeten folgende Standardeinstellungen des Gerätes:

<i>Stacking and Separation:</i>	475 V für 30 min
<i>Blocking Reagent:</i>	5 min
Primär-und Sekundärantikörper:	jeweils für 30 min
Luminol-Peroxid Chemolumineszenzmessung:	ca. 15 min (Belichtungszeiten von 1-2-4-8-16-32-64-128-512 s)

Das aus der Analyse resultierende Chemolumineszenzsignal wurde maschinell detektiert. Quantitative Ergebnisse wie Molekulargewicht, Signalintensität und Signal-Rausch-Verhältnis für jedes immunodetektierte Protein wurden automatisch in der assoziierten Software *Compass for Simple Western* (ProteinSimple, CA, USA) angezeigt. Mit den Mittelwerten der Signalintensitäten aller vier Mausgruppen (Signal-Rausch-Verhältnis ≥ 10) erfolgte anschließend die statistische Auswertung und grafische Darstellung.

3.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Funktion der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Im anschließenden Blotting-Verfahren werden spezifisch Proteine durch Bindung an markierte Liganden nachgewiesen.

Das Elektrophorese-Gel besteht aus einem vertikalen Trenngel, auf das eine dünne Schicht Sammelgel pipettiert wird. Für die Durchführung wurden gereinigte Glasplatten mit zwei Abstandshaltern in die Gelgießapparatur eingespannt und die zwei Gele, das Trenn- und das Sammelgel, vorbereitet. Die Gel-Mischungen wurden mit dem Radikalstarter Ammoniumperoxidsulfat (APS) sowie dem Polymerisationskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt und bläschenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Bevor das Sammelgel auspolymerisieren konnte, setzten wir einen Probenkamm zur Ausbildung von insgesamt 24 Auftragstaschen ein. Nach etwa einer Stunde Polymerisation wurden die Gelplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt und an die Kühlung angeschlossen, die Kammer mit Laufpuffer befüllt und der Probenkamm entfernt. Jeweils 20 μl der Proteinlysate, mittels 1x Laemmli-Puffer ohne Mercaptoethanol auf $c=1000 \mu\text{g/ml}$ verdünnt, wurden auf dem 12 % SDS-Elektrophoresegel mit einer konstanten Spannung von 200 V aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit hoher Proteinbindungskapazität

übertragen („*Blotting*“). Natriumdodecylsulfat (SDS) deckt die Ladungen der Proteine und führt zu einer negativen Gesamtladung. So können die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Die Membran wurde für 1 h in TBST 0,1 % Tween und 1 % Fischgelatine geblockt und anschließend für 2 h mit dem Primärantikörper (*Kap. 3.1*) inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 1 h eine Inkubation mit dem Streptavidin-Konjugat. Wir entwickelten die Membranen unter Verwendung von 10 ml Luminata Forte und belichteten sie anschließend für 10 min im BioRad Imager. Die solchermaßen entstandenen Banden ordneten wir dann mittels eines Markers spezifischen Molekulargewichten zu.

3.2.9 Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten

Die Daten der Enzymaktivitätsmessungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von den Mitarbeitern des Institutes für Nutztierbiologie und Wachstum, FBN Dummerstorf. Die gleichen Proben des *M. rectus femoris*, die auch für das RNASeq-basierte Transkriptomprofiling verwendet wurden, wurden mit einem Mörser unter Flüssigstickstoff zermahlen und mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer (4,2 mM Dikaliumphosphat; 5,8 mM Monokaliumphosphat; 150 mM Kaliumchlorid; 1 mM EDTA (pH= 6,9)) im Verhältnis 1:20 verdünnt. Die Homogenisierung der Proben erfolgte mit einem *Tissue Homogenizer* (Potter Elvehjem, Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA). Die so erhaltenen und verdünnten Muskelhomogenate wurden bei 14.000 x g (15 min, 4 °C) zentrifugiert und die resultierenden Überstände wurden auf Eis aufbewahrt. Alle Enzymaktivitätsuntersuchungen und die Bestimmung des Proteingehalts wurden am selben Tag durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten der Kreatin-Kinase (CK), der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) und der Laktat-Dehydrogenase (LDH) wurden wie von Lösel et al. beschrieben gemessen (Lösel et al. 2013): Die Messung der CK-Aktivität erfolgte bei 37 °C in den Muskelhomogenaten (1:400 verdünnt) mit einem kommerziellen Kit (Biomed, Oberschleißheim, Deutschland). Die LDH- und IDH-Aktivität wurde bei 25 °C nach modifizierten Testprotokollen von Sigma (<http://www.sigmaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/assay-library.html>) analysiert. Die LDH-Aktivität wurde in verdünnten (Verdünnung 1:20), die IDH-Aktivität in unverdünnten Muskelhomogenaten bestimmt. Der Proteingehalt der Muskelhomogenate (1:10 verdünnt) wurde nach Peterson analysiert (Peterson 1977). Alle Enzymaktivitäten und der Proteingehalt wurden mit dem Spectramax Plus384-Spektrophotometer/plate reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) bestimmt. Pro Tier wurden drei Messungen durchgeführt.

3.2.10 RNA-Extraktion für die Polymerasekettenreaktion

Um RNase-Freiheit zu gewährleisten und eine Kontamination der Proben zu verhindern, wurden vor jeder RNA-Präparation der Arbeitsplatz und alle benötigten Geräte mit RNaseTM AWAY (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) gereinigt. Die RNA wurde aus dem entnommenen Muskelgewebe des murinen Musculus rectus femoris gewonnen und erfolgte auf Grundlage der Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi 2006).

Dafür versetzten wir die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben mit 1 ml TRI-Reagent (Sigma), homogenisierten sie in der Precellys (6,0 m/s, 40 s) und ließen sie für 5 min bei RT inkubieren. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 100 µl Chloroform ohne Isoamylalkohol zugegeben. Dann folgte ein Inkubationsschritt von 15 min bei Raumtemperatur (RT) mit anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C). Die wässrige Phase gaben wir in ein neues Röhrchen, vermischten sie mit 500 µl Isopropanol und ließen sie erneut bei RT inkubieren (10 min). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 8 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Pellet mit 1 ml Ethanol (EtOH) (75 %) gewaschen. Wir entfernten das EtOH nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min), trockneten das RNA-Pellet im Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und lösten es abschließend in RNase-freiem Wasser.

Um eine Verunreinigung der gewonnenen RNA durch DNA zu vermeiden, wurde anschließend ein DNase Verdau durchgeführt. Wir verwendeten das RNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, CA, USA) zur weiteren Aufreinigung.

Die Extraktionsmethode basiert auf der Verwendung eines einzigartigen *Single-Buffer-Systems* und der Zymo-Spin-Säulenthechnologie, die eine selektive Gewinnung von RNA ermöglicht. Durch Zugabe von Bindungspuffer und Ethanol mit anschließendem Waschen und Elution in den Zymo-Spin IIC Säulen wurde die RNA zusätzlich aufgereinigt und konzentriert. Die Quantifizierung der erhaltenen RNA erfolgte mit dem Spectrophotometer (NanoDrop) mittels Absorptionsmessung der Proben bei 260 und 280 nm im Messduplikat. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm galt dabei zusätzlich als Maß für die Probenreinheit. Um die erforderliche Qualität zu gewährleisten, sollte dieser zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Die RNA-Proben lagerten wir bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.2.11 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkription wurde mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für diese Reaktion

verwendeten wir das GoScript™ Reverse Transcription System Kit (Promega Corporation, WI, USA).

Dafür wurden die RNA-Proben, deren RNA-Konzentrationen zuvor über das Spectrophotometer ermittelt wurden, mittels Nuklease-freiem Wasser auf eine gemeinsame Konzentration von jeweils $c=800$ ng/ μ l RNA pro Probe verdünnt. Zu je 4 μ l der verdünnten Probe wurden je 0,5 μ l Oligo-dT-Primer und Random Primer hinzugegeben, alles für 5 min bei 70 °C im Thermocycler erwärmt und danach sofort wieder für 5 min auf Eis gelagert. Nach anschließender kurzer Zentrifugation und erneuter Lagerung auf Eis pipettierten wir zu jeder Probe (à 5 μ l) 15 μ l des reverse-Transkription-Mixes, bestehend aus folgenden Substanzen:

Reverse-Transkription-Mix (je Probe 15 μ l):

GoScript™ 5x Reaction Buffer	4 μ l
MgCl ₂	2 μ l
PCR Nucleotide Mix (finale $c=0,5$ mM je dNTP)	1 μ l
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5 μ l
GoScript™ Reverse Transcriptase	1 μ l
Nuklease-freies Wasser	6,5 μ l

Wir stellten die Proben anschließend in den Thermocycler und ließen sie 5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C und 15 min bei 72 °C inkubieren. Bei einem Gesamtvolumen von 20 μ l für jeden Ansatz entsprach die cDNA-Konzentration $c=40$ ng/ μ l (RNA-Äquivalent). Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.12 Generierung spezifischer Primer und Primeretablierung

Die Primer wurden mit einer cDNA-Verdünnungsreihe auf ihre Funktionsfähigkeit in der qRT-PCR getestet. Dazu stellten wir aus den cDNA-Proben (*Kap. 3.2.11*) eine Poolprobe her. Aus dem so generierten cDNA-Pool wurde mittels Nuklease-freiem Wasser eine Verdünnungsreihe ($c=40$; 25; 12,5; 2,5; 1,25; 0,25; 0,125; 0 ng/ μ l) erstellt. Diese Proben analysierten wir im LightCycler® 480 unter Verwendung des Promega qRT-PCR Mixes in Doppelbestimmung. Für den PCR-Ansatz wurde folgendes Protokoll verwendet:

PCR-Ansatz (je 10 µl):	cDNA (c=25 ng/µl)	1 µl
	H ₂ O (ad 4,5 µl)	3,5 µl
	Primer-Mix (20 µM)	0,5 µl
	2x SYBR® Green Mastermix, Promega	5 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

PCR-Programm:

a) 1 Zyklus	Denaturierung und Enzymaktivierung:	95 °C	5 min
b) 45 Zyklen	Denaturierung:	95 °C	15s
	Amplifikation:	60 °C	10s
	Elongation und Quantifizierung:	72 °C	10s

c) Schmelzkurvenanalyse

Die Auswertung erfolgte mit der Software LightCycler®480 SW1.5. Die Ermittlung des Cp-Wertes der Verdünnungsreihe ermöglichte die Erstellung einer Standardkurve. Die sich daraus ergebende Effizienz sollte bei etwa 2 liegen. Primerpaare, für die keine Amplifikation, Cp-Werte >29 oder eine Effizienz außerhalb $1,7 < E < 2,2$ festgestellt wurden, konnten nicht für die anschließende PCR-Analyse im Fluidigm® BioMark HD-Systems verwendet werden. Die Betrachtung der Schmelzkurve der Amplifikate ermöglichte darüber hinaus eine Abschätzung, ob es zu unspezifischen Amplifikationen gekommen war. Solche Primer wurden ebenfalls von der folgenden Analyse ausgeschlossen.

3.2.13 Vergleich der Ergebnisse von Next Generation Sequencing und quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion

Für die gezielte Amplifikation spezifischer cDNA-Abschnitte jeder einzelnen Probe verdünnten wir die zuvor erstellten cDNA-Proben von der Initialkonzentration $c=40$ ng/µl mittels Nuklease-freien Wassers auf $c=25$ ng/µl. Für die Vorbereitung des Fluidigm® BioMark HD - Laufes beriteten wir zunächst den Primermix vor. Dafür wurden *Forward*- und *Reverse*-Primer aller zu amplifizierenden Gene in gleichem Verhältnis gemischt und mit TE-Suspensions-Puffer (10mM Tris; 1mM EDTA) auf eine Endkonzentration von $c=500$ nM gebracht. Für die *Specific Target Amplification* (STA) erstellten wir anschließend ein STA-Mastermix, der zu den auf 25 ng/µl verdünnten Proben sowie zur cDNA-Verdünnungsreihe hinzugegeben wurde. Der Mastermix bestand aus folgenden Substanzen:

Material & Methoden

STA-Mastermix (pro Reaktion 4 μ l):	2x TaqMan PreAmp Mastermix	2,5 μ l
	500 nM Primermix	0,5 μ l
	Nuklease-freies Wasser	1 μ l

Zusammen mit jeweils 1 μ l cDNA-Probe betrug das Gesamtvolumen pro Reaktion folglich 5 μ l. Nach Vorlage des STA-Mastermixes und anschließender Zugabe der cDNA wurde die Mischung einer Heizzyklus-Abfolge bestehend aus insgesamt 14 Zyklen unterzogen:

STA-Temperaturprofil:	95 °C	10 min	} 14x
	95 °C	15 s	
	60 °C	4 min	
	4 °C	<i>hold</i>	

Nach der STA versetzten wir jede Probe anschließend mit Exonuklease (Endkonzentration 4 U/ μ l) und unterzogen sie erneut einem Heizzyklus, um ungebundene Primer zu entfernen.

Exonuklease-Zugabe (je 2 μ l pro Probe):	Nuklease-freies Wasser	1,4 μ l
	<i>Exonuclease I Reaction Buffer</i>	0,2 μ l
	<i>Exonuclease I</i> (20 U/ μ l)	0,4 μ l

Temperaturprofil:	37 °C	30 min
	80 °C	15 min
	4 °C	<i>hold</i>

Die Proben wurden anschließend mit TE-Puffer 1:5 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Für die Durchführung der RT-PCR mittels des Fluidigm® BioMark HD-Systems bereiteten wir zunächst der Primermix vor. Dafür wurden je 10 μ l Forward und Reverse Primer (c=100 μ M) paarweise gemischt. Zu je 0,5 μ l des Primermixes gaben wir anschließend jeweils 4,5 μ l des Assay-Mixes hinzu. Der Assay-Mix setzte sich folgendermaßen zusammen:

Assay-Mix (je 4,5 μ l pro Probe):	2x Assay Loading Reagent	2,5 μ l
	1x DNA-Suspension Buffer (TE mit 0,1 mM EDTA)	2,0 μ l

überschreitet, ergibt sich daraus der Ct-Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwertzyklus). Der Ct-Wert ist folglich der Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Schwellenwertlinie. Er ist ein relatives Maß für die Konzentration des Ziels in der PCR-Reaktion. Aufgrund der Fluoreszenz bestimmten wir so für jede Primer/Sample-Kombination die Ct-Werte.

Als Maß für die Qualität jeder Amplifikation gilt der *Quality Threshold*. Dabei wird jede Amplifikationskurve mit einem idealen, exponentiellen Verlauf verglichen und mit einem Qualitätsscore von 0 (keine Übereinstimmung) bis 1 (idealer sigmoidaler Verlauf) bewertet. Von dem Programm als Standard festgelegt ist ein Wert von 0,65. Jede Amplifikationskurve mit einem kleineren Wert galt als ungültig. Aufgrund der unterschiedlichen Primer und damit Amplifikationsprodukte wurde der Ct-Wert von „*Auto global*“ auf „*Auto detector*“ geändert und damit für jedes Amplifikat/Primerpaar ein individueller *Threshold* festgelegt.

Ebenfalls kontrolliert wurden die Schmelzkurven der Amplifikationsprodukte, welche innerhalb eines Primers über alle Proben vergleichbar sein sollten. Anschließend wurden die ermittelten Ct-Werte in eine CSV-Datei exportiert.

Die Berechnung der relativen Expression der 41 ausgewählten Gene (*Kap. 3.1.3*) und Normalisierung über die 5 Haushaltsgene *Actb*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Rpl26* und *Rplp2* erfolgte mit dem Programm DAG (*Data Analysis Gene Expression*) Version 1.0.5.6 (Ballester et al. 2013). Nach Import der entsprechenden CSV-Dateien wurde festgelegt, ob es sich bei den Genen um Kontroll- oder Zielgene handelte und bei welchen Proben es sich um Standard mit welcher relativen Konzentration handelte. Proben der Standardreihe mit der Konzentration 25 ng/µl entsprachen den eingesetzten Proben, daher wurde für diese die „*Quantity*“ 1 festgelegt und daraus die „*Quantity*“ für die weiteren Proben der Standardreihe entsprechend berechnet.

Die Qualität der vorgesehenen Haushaltsgene (*Actb*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Rpl26* und *Rplp2*) überprüften wir mit dem in der Software Fluidigm® Real-Time PCR Analysis enthaltenen Software-Tool „*Find Control Gene-Stability*“. Das *M-value* gibt dabei Auskunft über die Gleichmäßigkeit der Expression über alle Proben hinweg. Das Gen *Hprt1* wurde aufgrund des hohen *M-values* als Haushaltsgen ausgeschlossen und die Analyse mit den verbleibenden fortgesetzt.

Die relative Quantifizierung wurde anhand der Standardkurve extrapoliert. Daher erfolgte eine Kontrolle der PCR Effizienz (Optimum: $E=1$) und der Qualität der linearen Regression (Optimum: $R^2=1$) für jedes Template. Die aufgrund der Standardreihe extrapolierte relative Expression (*Mean Quantity*) wurde mit Hilfe der ausgewählten Haushaltsgene normalisiert. Die so erhaltene normalisierte relative Expression (*Normalized Quantity*) wurde für die Berechnung der Mittelwerte der vier untersuchten Gruppen (DUhTP_TM; DUhTP_sed; DUC_TM; DUC_sed) herangezogen. Auf Basis dieser Expressionsdaten wurden für jeden paarweisen Gruppenvergleich analog zu den

NGS-Daten \log_2 Fold Change (FC) und p-Wert ermittelt. Die Berechnung von Signifikanzwerten erfolgte anhand des Student's t-Testes. Wir verglichen die p-Werte (*p-values*) der Expressionsunterschiede der ausgewählten Gene mit den Ergebnissen der NGS-Analyse und ließen ihren \log_2 FC zusätzlich in einer Punktwolke darstellen. Mittels des Webservers VassarStats (<http://vassarstats.net/>) wurden der Pearson-Korrelationskoeffizient r sowie der dazugehörige p-Wert (zweiseitiger unabhängiger t-Test) berechnet.

3.2.14 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen und grafischen Darstellungen in Form von Barplots und Boxplots führten wir mit dem Programm GraphPad Prism, Version 8.4.1 (Graphpad Software, San Diego, USA) durch. Die grafische Darstellung in Form von Barplots erfolgte unter Einbeziehung von Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*; SEM). Unter Einbeziehung der mit *edgeR* berechneten rohen p-Werte (Robinson et al. 2010), wobei als Cutoff $p < 0,05$ gesetzt wurde, wurden differentiell exprimierte Gene (DEGs) in den vier Vergleichen DUhTPvsDUC_sed; DUhTPvsDUC_TM; DUhTP_TM vs sed; DUC_TM vs sed ermittelt. Die Darstellung der DEGs in Form von Venn-Diagrammen erfolgte unter zusätzlicher Berücksichtigung des $|\log_2FC| \geq 1$ als Maß für die Stärke des Expressionsunterschiedes. Zur grafischen Veranschaulichung nutzten wir die Software *jvenn*[©] (<http://jvenn.toulouse.inra.fr>; Bardou et al. 2014). Der Vergleich der mittels des Fluidigm[®] BioMark HD-Systems ermittelten Expressionslevel, der Muskel- und Körpermassen sowie der Enzymaktivitäten erfolgte mittels des Student's t-Testes. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Die Signifikanzen der vorliegenden IPA-Analysen kalkulierten wir anhand des einseitigen exakten Fisher-Testes verwendeten sie nach Korrektur für multiples Testen für die Signalwegsanalysen (Cutoff $FDR < 0,05$, Benjamini und Hochberg 1995).

4 Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dargestellt. Zunächst werden wir Muskelmasse und Körpergewicht der untersuchten Mausgruppen betrachten, um anschließend detaillierter auf trainings- und linienspezifische Unterschiede des Muskeltranskriptoms einzugehen.

4.1 Phänotypische Veränderungen der Skelettmuskulatur

Die Phänotyp-Analyse ergab zwar sowohl im Vergleich der trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen als auch im Vergleich der trainierten DUC-Kontrollmäuse mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen tendenziell, nicht jedoch signifikant geringere Körpermassen der trainierten Individuen (*Tab. 9a, b*). Im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen hingegen waren die DUhTP-Marathonmäuse bereits augenscheinlich kleiner, was sich bei den gewogenen Körpermassen widerspiegelte. Im Vergleich zu den 8 untrainierten DUC-Kontrollmäusen zeigten die ebenfalls untrainierten 8 DUhTP-Marathonmäuse im Mittel eine um 19,5 % niedrigere Körpermasse ($p < 0,001$). Nach Laufbandtraining wiesen die 8 betrachteten Individuen der DUhTP-Marathonmauslinie im Mittel sogar eine um 22,0 % geringere Körpermasse als die Kontrolltiere auf ($p < 0,001$).

Tab. 9: Phänotypische Kenngrößen der untersuchten Mausgruppen

a)	n	Körpergewicht [g]	Musculus rectus femoris [g]
DUhTP			
_sed	8	32,37 ± 1,60	0,422 ± 0,035
_TM	8	30,27 ± 1,79	0,387 ± 0,030
DUC			
_sed	8	40,21 ± 2,04	0,498 ± 0,043
_TM	8	38,78 ± 2,43	0,463 ± 0,074

a) Körpergewicht sowie Gewicht der Oberschenkelmuskulatur (M. rectus femoris) pro Gruppe. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. *DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance/ „Marathonmaus“; _sed: ohne Laufbandtraining; _TM: mit Laufbandtraining.*

b) Vergleiche	Körpergewicht p-Wert	Musculus rectus femoris p-Wert
DUhTPvsDUC_sed	<0,001	0,032
DUhTPvsDUC_TM	<0,001	0,030
DUhTP_TMvsDUC_sed	0,219	0,535
DUC_TMvsDUC_sed	0,541	0,552
DUhTPvsDUC	<0,001	<0,001

b) Darstellung der Signifikanzwerte. Als signifikant galt $p < 0,05$ (Student's t-Test).

Ergebnisse

Bei Betrachtung des Oberschenkels (M. rectus femoris) ergaben sich sowohl innerhalb der DUhTP-Marathonmauslinie als auch innerhalb der DUC-Kontrolllinie ebenfalls keine signifikanten trainingsbedingten Veränderungen der mittleren Masse. Im Vergleich zu untrainierten DUC-Kontrollmäusen hingegen wiesen untrainierte DUhTP-Marathonmäuse eine um 15,3 % ($p < 0,05$) verminderte mittlere Masse des Oberschenkels auf. Im Vergleich der trainierten Individuen beider Linien miteinander ergab sich für die trainierten DUhTP-Marathonmäuse eine um 16,4 % signifikant verminderte ($p < 0,05$) mittlere Oberschenkelmasse.

Sowohl mit als auch ohne Laufbandtraining wiesen die betrachteten Mäuse der DUhTP-Marathonmauslinie im Vergleich zu denen der Kontrolllinie DUC im Mittel eine verminderte Körpermasse mit gleichzeitig verringerter Masse der Oberschenkelmuskulatur auf. Signifikante Unterschiede der Körper- und Oberschenkelmasse im Vergleich von trainierten mit untrainierten Mäusen einer der beiden Mauslinien (DUhTP-Marathonmaus oder DUC-Kontrollmaus) zeigten sich im Zuge des Laufbandtrainings jedoch nicht.

4.2 Qualitätskontrolle und Validierung der Genexpressionsdaten

Die NGS-Analysen durch Herrn Dr. N. Trakooljul wurden an den Mm. recti femoris von insgesamt 32 Mäusen durchgeführt (*Kap. 3.2.3*). Eine Qualitätskontrolle der erhaltenen Transkriptomdaten durch Herrn Dr. N. Trakooljul erfolgte mittels des R-Paketes *edgeR*. Der Datensatz wurde in einer zweidimensionalen Darstellung visualisiert (*Abb. 8; S. 42*).

Ergebnisse

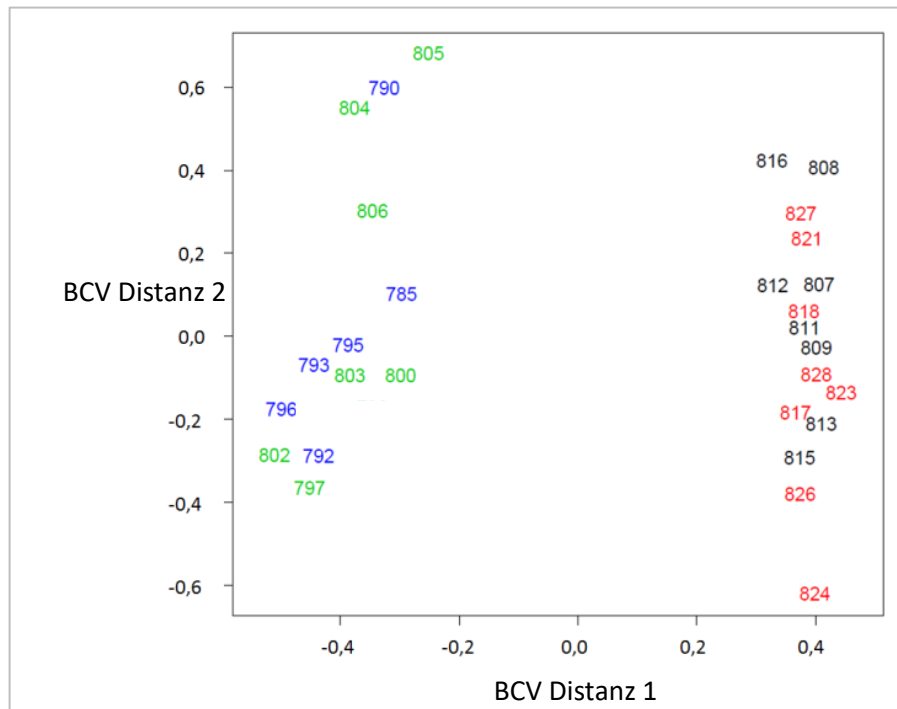


Abb. 8: Dimensionsreduktions-Darstellung des gesamten NGS-Datensatzes (32 Mäuse, 13982 Gene). Dargestellt sind die ersten beiden Dimensionen des biological coefficient of variation (BCV), die mittels des R-Paketes edgeR berechnet wurden. Jeder in Form einer Nummer kodierter Datenpunkt entspricht dem Transkriptomprofil (M. rectus femoris) einer Maus. Die betrachteten Gruppen werden farblich voneinander unterschieden (grün: DUC_sed; blau: DUC_TM; rot: DUhTP_sed; schwarz: DUhTP_TM). Proben, deren Transkriptomprofil sich unterscheidet, liegen weit auseinander. *DUC*: Dummerstorf-Kontrolllinie; *DUhTP*: Dummerstorf high Treadmill Performance; *_sed*: ohne Laufbandtraining; *_TM*: mit Laufbandtraining

Die Validierung der NGS-Daten aller 32 Muskelproben erfolgte wie in *Kap. 3.2.13* beschrieben mittels des Fluidigm® BioMark HD-Systems. Es wurden 41 Transkriptlevel mit PCR gemessen und die erhobenen Daten über die Daten der vier Haushaltsgene *Actb*, *Pgk1*, *Rpl26* und *Rplp2* normalisiert. Wie anhand *Abb. 9* (S. 43) ersichtlich, zeigte die Mehrheit der ausgewählten Gene einen niedrigen \log_2FC in den Daten von beiden Messmethoden. Es zeigte sich eine mittlere ($0,50 < r < 0,70$) bis hohe ($r = 0,89$) Korrelation für die (für die paarweisen Gruppenvergleiche berechneten) \log_2FC auf Basis der Daten (Expressionslevel) der beiden verwendeten Messmethoden ($p < 0,05$).

Ergebnisse

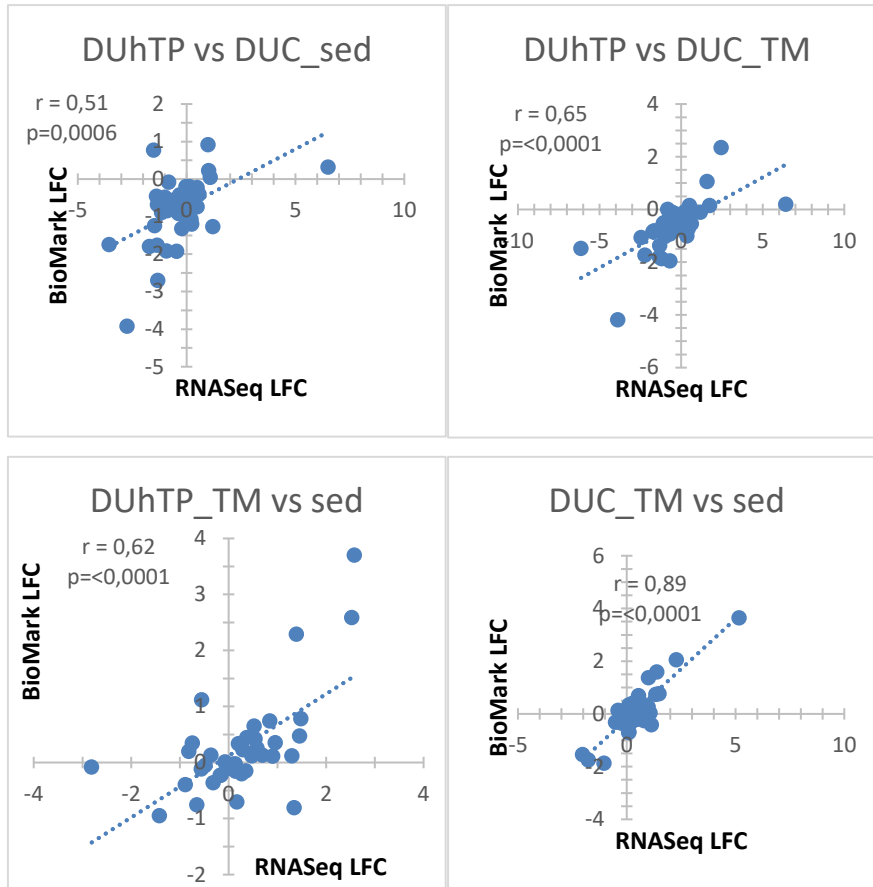


Abb. 9: Validierung der RNASeq-Ergebnisse mittels PCR. Die Validierung erfolgte mittels Fluidigm® BioMark HD - System. Die Punktwolken zeigen die Korrelation zwischen den durch RNASeq und den durch PCR ermittelten \log_2 FC (LFC). Jeder Punkt entspricht dem LFC-Wertepaar eines spezifischen Gens. Es wurden jeweils 41 Gene für die Ermittlung des Pearson-Korrelationskoeffizienten r hinzugezogen. Die gestrichelte Linie entspricht der linearen Regressionsgeraden. Alle zur Validierung verwendeten Primer sind in Tab. 5 (S. 19) aufgeführt. *DUC*: Dummerstorf-Kontrolllinie; *DUhTP*: Dummerstorf high Treadmill Performance; *p*: *p*-Wert; *_sed*: ohne Laufbandtraining; *_TM*: mit Laufbandtraining

4.3 Transkriptionelle Veränderungen im Oberschenkelmuskel (M. rectus femoris)

Die muskuläre Genexpression wurde in trainierten und untrainierten DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mittels NGS untersucht und in 4 Vergleichen betrachtet, um sowohl selektions- als auch trainingsbedingte Anpassungen in den Mausmodellen zu identifizieren. Zum einen wurden die differentiell exprimierte Transkripte zwischen untrainierten DUhTP-Marathonmäusen und untrainierten DUC-Kontrollmäusen (DUhTP_sed vs DUC_sed) ermittelt. Zum anderen wurde der Einfluss des dreiwöchigen Trainings auf die muskuläre Genexpression sowohl innerhalb der DUC-Kontrollmäuse (DUC_TM vs sed) als auch innerhalb der DUhTP-Marathonmäuse (DUhTP_TM vs sed) betrachtet. Zudem erfolgte ein Direktvergleich von trainierten DUhTP-Marathonmäusen mit trainierten DUC-Kontrollmäusen im vierten Vergleich (DUhTP_TM vs DUC_TM). Mittels NGS wurden insgesamt 13982 exprimierte Gene im M. rectus femoris identifiziert. Auf Basis der cpm-Werte wurden die 4 paarweisen Vergleiche durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden in den vier Vergleichen die Gene identifiziert, die in den betrachteten Mausgruppen signifikant unterschiedlich exprimiert waren (*Tab. 10; S. 45*).

Im Vergleich der 8 trainierten DUC-Kontrollmäuse mit den 8 untrainierten DUC-Kontrollmäusen (*Tab. 10, D*) zeigten sich insgesamt 1491 differentiell exprimierte Gene (DEGs; $p < 0,05$, *Kap. 3.2.14*), wovon 188 DEGs deutlich ($|\log_2FC| \geq 1$) verändert exprimiert waren. Davon war der überwiegende Anteil (82,4 %) in den trainierten DUC-Kontrollmäusen vermehrt exprimiert.

Im Vergleich der 8 trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit den 8 untrainierten DUhTP-Marathonmäusen ergaben die NGS-Analysen insgesamt 3507 DEGs (*Tab. 10, C*). Davon waren 199 DEGs deutlich verändert exprimiert. Das Verhältnis von Genen, die in den trainierten Mäusen vermehrt (45,2 %) exprimiert waren, zu den Genen, die vermindert exprimiert waren (54,8 %), war dabei annähernd ausgeglichen.

Die größten Veränderungen auf Transkriptebene ließen sich im Vergleich beider Mauslinien miteinander feststellen (*Tab. 10, A und B*). Hierbei zeigten sich im Vergleich der 8 trainierten DUC-Kontrollmäuse mit den 8 trainierten DUhTP-Marathonmäusen insgesamt 7775 signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich exprimierte Gene (*Tab. 10, B*). Die meisten DEGs (76,1 % der deutlich verändert exprimierten DEGs) zeigten deutlich niedrigere Transkript-Abundanz in den trainierten DUhTP-Marathonmäusen (im Vergleich zu den trainierten DUC-Kontrollmäusen).

Im Vergleich der 8 untrainierten DUhTP-Marathonmäuse mit den 8 untrainierten DUC-Kontrollmäusen zeigten sich insgesamt 6857 DEGs. Davon waren 695 DEGs deutlich verändert exprimiert (*Tab. 10, A*). Der überwiegende Anteil davon (64,2 %) wies eine verminderte Expression in den untrainierten DUhTP-Marathonmäusen auf.

Ergebnisse

Zusammenfassend wurden im Vergleich der trainierten mit untrainierten Individuen einer Linie (trainingsbedingt) insgesamt weniger Unterschiede auf Transkriptebene als selektionsbedingt gesehen. Zusätzlich zeigten sich im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen in den DUhTP-Marathonmäusen überwiegend herunterregulierte Gene.

Tab. 10: Anzahl unterschiedlich exprimierter Transkriptionsprodukte im Gruppenvergleich.

Vergleiche	DEGs [n] (p < 0,05)		
		Vermehrte Expression (p < 0,05; log ₂ FC ≥ 1)	Verminderte Expression (p < 0,05; log ₂ FC ≤ -1)
A) DUhTP_sed vs DUC_sed	6857	249	446
B) DUhTP_TM vs DUC_TM	77675	278	887
C) DUhTP_TM vs sed	3507	90	109
D) DUC_TM vs sed	1491	155	33

DEGs: differentiell exprimierte Gene; DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance; FC: Fold Change; n: Anzahl; _sed: ohne Laufbandtraining; _TM: mit Laufbandtraining

Ein Kreuzvergleich der Gene, die in untrainierten DUhTP- versus untrainierten DUC-Mäusen (A) und trainierten DUhTP- versus trainierten DUC-Mäusen (B) differentiell exprimiert waren ($p < 0,05$; $|\log_2FC| \geq 1$), ergab 463 Gene, die den beiden Listen von DEGs gemeinsam waren (*Abb. 10; S. 46*). Die Schnittmenge der beiden Vergleiche beinhaltete u.a. die Gene *Mstn* und *Nox4*, die in DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen unabhängig vom Laufbandtraining vermindert exprimiert waren.

Der Kreuzvergleich der Gene, die in trainierten DUhTP- versus untrainierten DUhTP-Mäusen und trainierten DUC- versus untrainierten DUC-Mäusen differentiell exprimiert wurden, ergab mit 29 Genen eine gering ausgeprägte Schnittmenge (*Abb. 11; S. 46*). Unter den 159 DEGs, die spezifisch für die trainierten DUC-Kontrollmäuse waren, befanden sich *Chrna1*, *Chrng*, *Myh3*, *Myl4*, *Myog* und *Mymk*. Spezifische DEGs für die trainierten DUhTP-Marathonmäuse waren z.B. *Hif3a*, *Hspala*, *Hspalb* und *Ppargcla*.

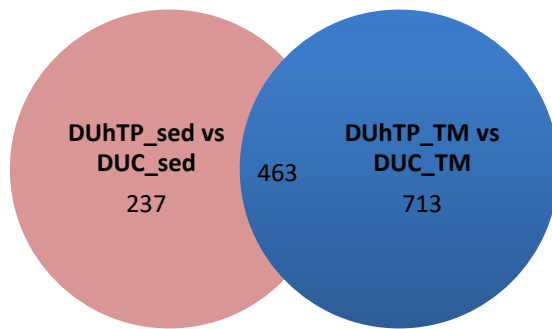


Abb. 10: Venn-Diagramm der detektierten DEGs des Linienvergleiches. Es erfolgte ein Kreuzvergleich der DEG-Listen untrainierte DUhTP-Marathonmäuse vs untrainierte DUC-Kontrollmäuse und trainierten DUhTP-Marathonmäuse vs trainierte DUC-Kontrollmäuse. Dargestellt ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene (FDR<0,05; $|\log_2FC| \geq 1$). Im Vergleich untrainierte DUhTP- mit untrainierten DUC-Mäusen vs trainierte DUhTP- mit trainierten DUC-Mäusen waren 463 Gene konsistent im Muskel differentiell exprimiert. *DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance; FC: Fold Change; _sed: ohne Laufbandtraining; _TM: mit Laufbandtraining*

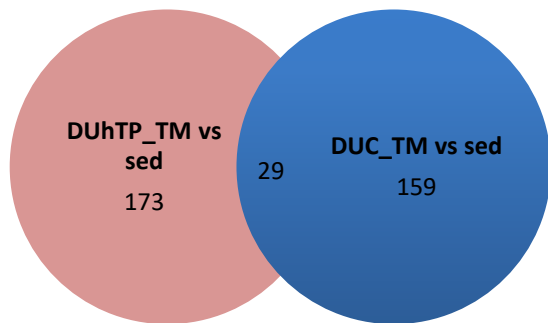


Abb. 11: Venn-Diagramm der detektierten DEGs des Trainingsvergleiches. Es erfolgte ein Kreuzvergleich der DEG-Listen trainierte DUhTP-Marathonmäuse vs untrainierte DUhTP-Marathonmäuse und trainierten DUC-Kontrollmäuse vs untrainierte DUC-Kontrollmäuse. Im Vergleich trainierte vs untrainierte Mäuse der beiden unterschiedlichen Mauslinien waren 29 Gene konsistent im Muskel differentiell exprimiert. Für zusätzliche Erklärungen vgl. Abb. 10.

Unter Berücksichtigung des \log_2FC als Maß für die Stärke der Veränderung in der Genexpression wurde für alle vier Vergleiche eine Hitliste von DEGs generiert (Tab. 11-14; S. 47-50). Die größten Unterschiede konnten dabei im Linienvergleich gesehen werden (Tab. 11; 12): Im Vergleich der trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit den trainierten DUC-Kontrollmäusen war das vorhergesagte Gen Gm6472 am stärksten verändert exprimiert ($\log_2FC = -7,962$). Auch im Vergleich der untrainierten Tiere beider Linien zeigte sich für dieses Gentranskript im Mittel eine deutliche Herunterregulation in den DUhTP-Marathonmäusen (Tab. 11). Die (im Vergleich der beiden Gruppen *DUC_sed* und *DUhTP_sed*) in der Gruppe *DUhTP_sed* am deutlichsten vermehrt exprimierten Moleküle waren das *ribosomal protein S2*, *pseudogene 13* und das *ribosomal protein S26*, *pseudogene 1* (Tab. 11).

Ergebnisse

Generell zeigte sich, dass das Training in den Mäusen beider Linien unterschiedliche Effekte hervorrief: Wie bereits in der Betrachtung der Anzahl aller unterschiedlich exprimierten Gene bemerkt (Tab. 10; S. 45), waren innerhalb des Vergleiches DUC_TM vs sed die Expressionsunterschiede weniger stark ausgeprägt (Tab. 14; S. 50). Im Vergleich der trainierten DUC-Mäuse mit den untrainierten DUC-Mäusen wurden Genprodukte wie Mymk ($\log_2FC=5,158$), Myh3 ($\log_2FC=3,937$) und Chrng ($\log_2FC=3,865$) (Tab. 14) in den trainierten Individuen vermehrt exprimiert. In der DUhTP-Marathonmauslinie hingegen waren trainingsassoziiert *RIKEN cDNA B230311B06 gene* ($\log_2FC=3,435$) und *expressed sequence AI506816* ($\log_2FC=3,102$) sowie Genprodukte wie Atf3 ($\log_2FC=2,577$) und Hspa1b ($\log_2FC=2,299$) stärker exprimiert (Tab. 13; S. 49).

Tab. 11: DUhTP vs DUC_sed, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte ($p<0,05$).

DUhTP_sed vs DUC_sed							
Hochregulierte Moleküle				Herunterregulierte Moleküle			
Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Genname ¹	Ratio (\log_2FC)	Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Genname ¹	Ratio (\log_2FC)
ENSMUSG00000081684	Rps2-ps13	<i>ribosomal protein S2, pseudo-gene 13</i>	6,497	ENSMUSG00000031027	Stk33	<i>serine/threonine kinase 33</i>	-7,891
ENSMUSG00000059775	Rps26-ps1	<i>ribosomal protein S26, pseudo-gene 1</i>	6,359	ENSMUSG00000095597	Gm6472	<i>predicted gene 6472</i>	-7,604
ENSMUSG00000091580	Gm6467	<i>predicted gene 6467</i>	4,727	ENSMUSG00000062353	Gm15772	<i>predicted gene 15772</i>	-7,477
ENSMUSG00000045036	Tmem232	<i>transmembrane protein 232</i>	4,482	ENSMUSG00000091383	Hist1h2al	<i>histone cluster 1, H2al</i>	-7,053
ENSMUSG00000097906	Gm9625	<i>predicted gene 9625</i>	4,363	ENSMUSG00000082474	Gm8213	<i>predicted gene 58213</i>	-6,920
ENSMUSG00000069962	Gm5356	<i>predicted gene 5356</i>	4,251	ENSMUSG000000109284	B230311B06Rik	<i>RIKEN cDNA B230311B06 gene</i>	-6,796
ENSMUSG00000051255	Gm6563	<i>predicted gene 6563</i>	4,020	ENSMUSG00000050936	Gm42743	<i>predicted gene 42743</i>	-6,509
ENSMUSG00000098915	Rpl15-ps2	<i>ribosomal protein L15, pseudo-gene 2</i>	3,943	ENSMUSG00000093880	Tmem181c-ps	<i>transmembrane protein 181C, pseudo-gene</i>	-6,376
ENSMUSG00000083708	Gm13123	<i>predicted gene 13123</i>	3,891	ENSMUSG00000059647	Cbx3-ps7	<i>chromobox 3, pseudo-gene 7</i>	-5,975
ENSMUSG00000091754	Gm3636	<i>predicted gene 3636</i>	3,697	ENSMUSG00000091478	Gm10039	<i>predicted pseudo-gene 10039</i>	-5,722

Ergebnisse

(vorherige Seite) Verglichen wurden untrainierte DUhTP-Marathonmäuse mit untrainierten Kontrollen der Linie DUC. Der \log_2 (Fold Change) als Maßzahl für die differentielle RNA-Transkriptmenge in beiden Gruppen (Ratio) bildete das Auswahlkriterium zur Erstellung der Hitliste. *DUC*: Dummerstorf-Kontrolllinie; *DUhTP*: Dummerstorf high Treadmill Performance; *_sed*: ohne Laufbandtraining; ¹ von <https://www.uniprot.org>

Tab. 12: DUhTP vs DUC_TM, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte (p<0,05)

DUhTP_TM vs DUC_TM							
Hochregulierte Moleküle				Herunterregulierte Moleküle			
Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Genname ¹	Ratio (log ₂ FC)	Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Genname ¹	Ratio (log ₂ FC)
ENSMUSG00000059775	Rps26-ps1	<i>ribosomal protein S26, pseudo-gene 1</i>	7,128	ENSMUSG00000095597	Gm6472	<i>predicted gene 6472</i>	-7,962
ENSMUSG00000081684	Rps2-ps13	<i>ribosomal protein S2, pseudo-gene 13</i>	6,407	ENSMUSG00000050936	Gm42743	<i>predicted gene 42743</i>	-7,750
ENSMUSG00000098915	Rpl15-ps2	<i>ribosomal protein L15, pseudo-gene 2</i>	5,144	ENSMUSG00000062353	Gm15772	<i>predicted gene 15772</i>	-6,926
ENSMUSG00000091580	Gm6467	<i>predicted gene 6467</i>	4,941	ENSMUSG00000076612	Ighg2c	<i>immunoglobulin heavy constant gamma 2C</i>	-6,878
ENSMUSG00000057262	Gm10020	<i>predicted gene 10020</i>	4,742	ENSMUSG00000031027	Stk33	<i>serine/threonine kinase 33</i>	-6,825
ENSMUSG00000098470	C1rb	<i>Complement C1r-β Subcomponent</i>	4,666	ENSMUSG00000091383	Hist1h2al	<i>histone cluster 1, H2al</i>	-6,823
ENSMUSG00000051255	Gm6563	<i>predicted pseudogene 6563</i>	4,396	ENSMUSG00000012163	Gm8188	<i>predicted gene 8188</i>	-6,577
ENSMUSG00000085783	Gm9816	<i>predicted pseudo-gene 9816</i>	4,330	ENSMUSG00000059647	Cbx3-ps7	<i>chromobox 3, pseudo-gene 7</i>	-6,293
ENSMUSG00000072324	Gm8420	<i>predicted pseudogene 8420</i>	4,171	ENSMUSG00000012064	Ac161114.1	<i>HEAT repeat-containing protein 5A</i>	-6,159
ENSMUSG00000084403	Rps15a-ps8	<i>ribosomal protein S15A, pseudo-gene 8</i>	4,148	ENSMUSG00000054385	Ceacam2	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 2</i>	-6,138

Verglichen wurden die auf dem Laufband trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit ihren ebenfalls trainierten Kontrollen DUC. DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance; FC: Fold Change; _TM: mit Laufbandtraining; ¹ von <https://www.uniprot.org>

Ergebnisse

Tab. 13: DUhTP_TM vs sed, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte (p<0,05)

DUhTP_TM vs sed							
Hochregulierte Moleküle				Herunterregulierte Moleküle			
Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Gename ¹	Ratio (log ₂ FC)	Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Gename ¹	Ratio (log ₂ FC)
ENSMUSG00000109284	B230311B06 Rik	<i>RIKEN cDNA B230311B06 gene</i>	3,435	ENSMUSG00000082844	Gm13537	<i>predicted gene 13537</i>	-5,433
ENSMUSG00000105987	A1506816	<i>expressed sequence A1506816</i>	3,102	ENSMUSG00000047676	Rpsa-ps10	<i>ribosomal protein S1, pseudo-gene 10</i>	-4,027
ENSMUSG00000113737	BB123696	<i>expressed sequence BB123696</i>	2,736	ENSMUSG00000082693	Gm15190	<i>predicted gene 15190</i>	-3,931
ENSMUSG00000026628	Atf3	<i>activating transcription factor 3</i>	2,577	ENSMUSG00000112064	AC161114.1	<i>HEAT repeat-containing protein 5A</i>	-3,128
ENSMUSG00000055866	Per2	<i>period circadian clock 2</i>	2,524	ENSMUSG00000031737	Irx5	<i>Iroquois homeobox 5</i>	-3,074
ENSMUSG00000038550	Ciart	<i>circadian associated repressor of transcription</i>	2,524	ENSMUSG00000064342	mt-Ti	<i>mitochondrially encoded tRNA isoleucine</i>	-2,926
ENSMUSG00000087242	C78197	<i>expressed sequence C78197</i>	2,508	ENSMUSG00000054385	Ceacam2	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 2</i>	-2,810
ENSMUSG00000048520	Fbxl13	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 13</i>	2,428	ENSMUSG00000083019	Gm6222	<i>predicted gene 6222</i>	-2,577
ENSMUSG00000090877	Hspa1b	<i>heat shock protein 1B</i>	2,299	ENSMUSG00000091957	Rps2-ps10	<i>ribosomal protein S2, pseudo-gene 10</i>	-2,510
ENSMUSG00000031027	Stk33	<i>Serine/Threonine Kinase 33</i>	2,287	ENSMUSG00000112163	Gm8188	<i>predicted gene 8188</i>	-2,492

Verglichen wurden die trainierten mit den untrainierten DUhTP-Marathonmäusen. DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance; FC: Fold Change; _sed: ohne Laufbandtraining; _TM: mit Laufbandtraining; ¹ von <https://www.uniprot.org>

Ergebnisse

Tab. 14: DUC_TM vs sed, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte (p<0,05)

DUC_TM vs sed							
Hochregulierte Moleküle				Herunterregulierte Moleküle			
Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Gename ¹	Ratio (log ₂ FC)	Ensembl Gen-ID	Gensymbol	Gename ¹	Ratio (log ₂ FC)
ENSMUSG00000009214	Mymk	<i>myomaker</i>	5,158	ENSMUSG000000092281	Hmgb1-ps7	<i>high-mobility group high mobility group box 1, pseudo-gene 7</i>	-3,224
ENSMUSG000000020908	Myh3	<i>myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic</i>	3,937	ENSMUSG000000081455	Hmgb1-ps3	<i>high mobility group box 1, pseudo-gene 3</i>	-3,088
ENSMUSG000000026253	Chrn3	<i>cholinergic receptor, nicotinic, gamma polypeptide</i>	3,865	ENSMUSG000000060441	Trim5	<i>tripartite motif-containing 5</i>	-2,031
ENSMUSG000000061086	My14	<i>myosin, light polypeptide 4</i>	3,265	ENSMUSG000000057054	Inca1	<i>inhibitor of CDK, cyclin A1 interacting protein 1</i>	-1,761
ENSMUSG000000048520	Fbxl13	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 13</i>	2,715	ENSMUSG000000084403	Rps15a-ps8	<i>ribosomal protein S15A, pseudo-gene 8</i>	-1,593
ENSMUSG000000023992	Trem2	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>	2,713	ENSMUSG000000058626	Capn11	<i>Calpain 11</i>	-1,589
ENSMUSG000000069962	Gm5356	<i>Predicted gene 5356</i>	2,572	ENSMUSG000000060550	H2-Q7	<i>H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain</i>	-1,573
ENSMUSG000000046805	Mpeg1	<i>macrophage expressed gene 1</i>	2,397	ENSMUSG000000022041	Chrna2	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 2 Subunit</i>	-1,566
ENSMUSG000000026414	Tnnt2	<i>troponin T2, cardiac</i>	2,390	ENSMUSG000000072949	Acot1	<i>Acyl-CoA Thioesterase 1</i>	-1,373
ENSMUSG000000024803	Ankrd1	<i>ankyrin repeat domain 1</i>	2,281	ENSMUSG000000030155	Clec2e	<i>C-type lectin domain family 2 member E</i>	-1,369

Verglichen wurden die trainierten mit den untrainierten Kontrollmäusen DUC. DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; FC: Fold Change; _sed: ohne Laufbandtraining; _TM: mit Laufbandtraining; ¹ von <https://www.uniprot.org>

4.4 Beteiligung differentiell exprimierter Gene an muskulären Signalwegen

Um funktionelle Aussagen zu ermöglichen, wurden weiterführende Analysen mit IPA durchgeführt. Dabei wurden die Expressionsdaten anhand der IPKB mit Ergebnissen der aktuellen Literatur (Stand Dezember 2019) abgeglichen und spezifischen Signalwegen zugeordnet. Es entstand so für jeden Vergleich eine Rangliste der Signalwege, in denen die DEGs in besonderem Maße überrepräsentiert waren. In allen vier Vergleichen war der EIF2 (eukaryotischer Initiationsfaktor 2) -Signalweg mit darin enthaltenen RNA-Transkripten wie Gsk3b, Igflr, PI3K, *Extracellular-signal Regulated Kinase 1* (Mapk3) und *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (Pdpk1) unter der Liste der Top 15-Signalwege vertreten (*Abb. 12, 13; S. 52-53*). Bei der Betrachtung der Signalwege, in denen die DEGs sowohl aus dem Vergleich trainierter DUhTP-Marathonmäuse mit trainierten DUC-Kontrollmäusen (DUhTPvsDUC_TM) als auch aus dem Vergleich untrainierter Individuen beider Linien (DUhTPvsDUC_sed) überrepräsentiert waren, wurden unter den Top 15 Signalwegen 11 weitere (neben dem EIF2-Signalweg) Signalwege identifiziert, denen überproportional mehr DEGs angehörten (*Abb. 12, dunkelgrau markiert*). Dies waren die Signalwege *Estrogen Receptor Signaling*, *Huntington's Disease Signaling*, *Mitochondrial Dysfunction*, *Molecular Mechanisms of Cancer*, *mTOR Signaling*, *NGF Signaling*, *NRF2-mediated Oxidative Stress Response*, *Oxidative Phosphorylation*, *Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling*, *Protein Ubiquitination Pathway* und *Sirtuin Signaling Pathway*.

In der Liste der Top 15-Signalwege waren sowohl im Vergleich trainierter DUhTP-Marathonmäuse mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen (DUhTP_TM vs sed) als auch im Vergleich trainierter DUC-Kontrollmäuse mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen (DUC_TM vs sed) die *Integrin Linked Kinase* (ILK)-, *Pancreatic Adenocarcinoma*- und *Epithelial Adherens Junction*- Signalwege vertreten (*Abb. 13, gelb hinterlegt*). Die Analyse der jeweils nur in einer Linie nach körperlicher Aktivität veränderten DEGs ergab jedoch für beide Vergleiche (DUC_TM vs sed und DUhTP_TM vs sed) unterschiedliche damit assoziierte Signalwege: So waren im Vergleich DUC_TM vs sed neben mit dem zirkadianen Rhythmus assoziierten Genen insbesondere Gene des Calciumsignalweges (Chrng und Chrna1, beide hochreguliert) in den DEGs überrepräsentiert. Dahingegen konnten im Vergleich DUhTP_TM vs sed die identifizierten DEGs dem Integrin-Signalweg sowie dem Signalweg *Virus Entry via Endocytic Pathways* zugeordnet werden (*Abb. 13*).

Ergebnisse

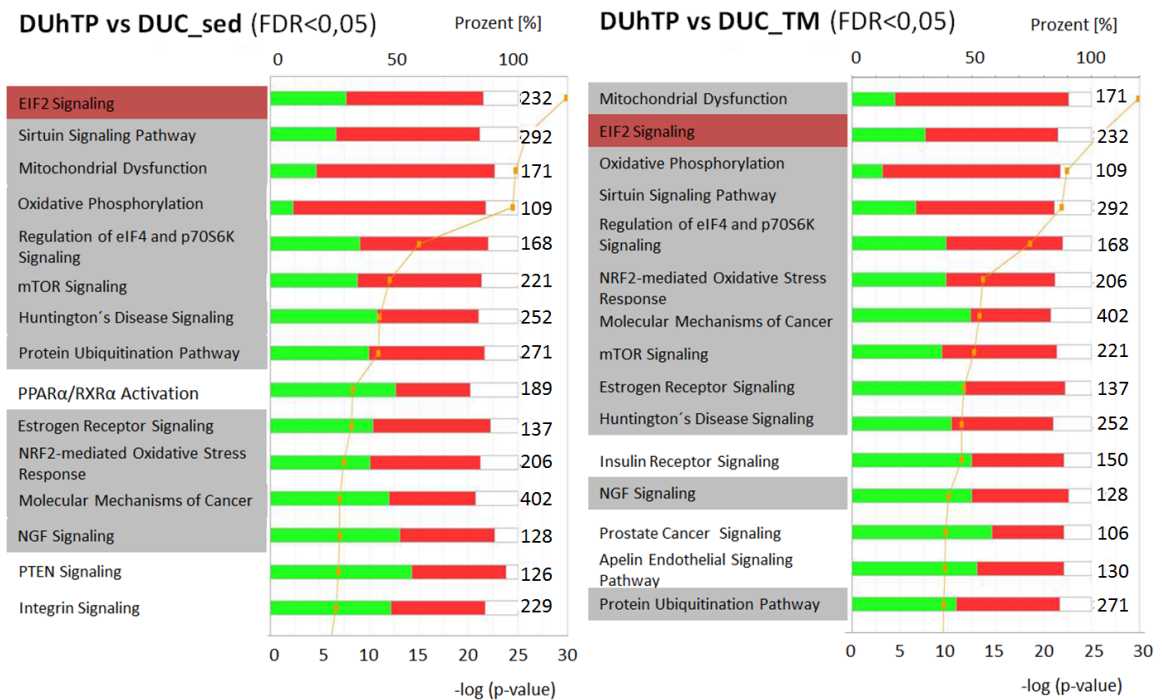


Abb. 12: Auf RNA-Ebene im Muskel modulierte Signalwege im Vergleich von DUhTP-Marathonmäusen zu DUC-Kontrollmäusen. Dargestellt sind die Top 15 der Signalwege, deren Gene unter den DEGs im Vergleich von Mäusen beider Mauslinien mit und ohne Laufbandtraining im M. rectus femoris mit einer Falscherkennungsrate von $FDR < 0,05$ signifikant überrepräsentiert waren (Qiagen, IPA; <https://digitalinsights.qiagen.com>). Sowohl im Vergleich der untrainierten DUhTP-Marathonmäuse mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen als auch im Vergleich der trainierten Individuen beider Linien miteinander gab es deutliche Überschneidungen bezüglich der Top 15 Signalwege (grau hinterlegt). Der EIF2-Signalweg war in allen vier Vergleichen unter den Top 15 Signalwegen vertreten (rot hinterlegt).

Die Gesamtanzahl der mit dem jeweiligen Signalweg assoziierten Gene ist rechts der Säulen dargestellt. Die Färbung der Säulen repräsentiert den prozentualen Anteil aller am betrachteten Signalweg beteiligten Gene, wobei gilt: rot= Hochregulation in den DUhTP-Marathonmäusen, grün=Herunterregulation in den DUhTP-Marathonmäusen gegenüber den DUC-Kontrollmäusen. Der weiß gefärbte Anteil der Säulen repräsentiert den Anteil ohne Überschneidung mit den zur Verfügung gestellten Daten. Die orangefarbene Linie repräsentiert den $-\log(p\text{-value})$ jedes Signalweges. *DUC*: Dummerstorf-Kontrolllinie; *DUhTP*: Dummerstorf high Treadmill Performance; *EIF*: eukaryotischer Initiationsfaktor; *eNOS*: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; *FDR*: False Discovery Rate; *GM-CSF*: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; *IGF-1*: Insulin-like growth factor 1; *ILK*: Integrin-linked kinase; *IL-8*: Interleukin 8; *IPA*: Ingenuity Pathway Analysis; *mTOR*: mammalian Target of Rapamycin; *NGF*: Nervenwachstumsfaktor; *NRF2*: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; *PPAR*: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor; *PTEN*: Phosphatase and Tensin homolog; *RXR*: Retinoid X receptor; *SPINK1*: serine protease inhibitor Kazal-type 1; *VEGF*: Vascular endothelial growth factor. Die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung liegt vor (Kap. 9.4). Es gilt die CC-BY-Lizenz 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>).

Ergebnisse

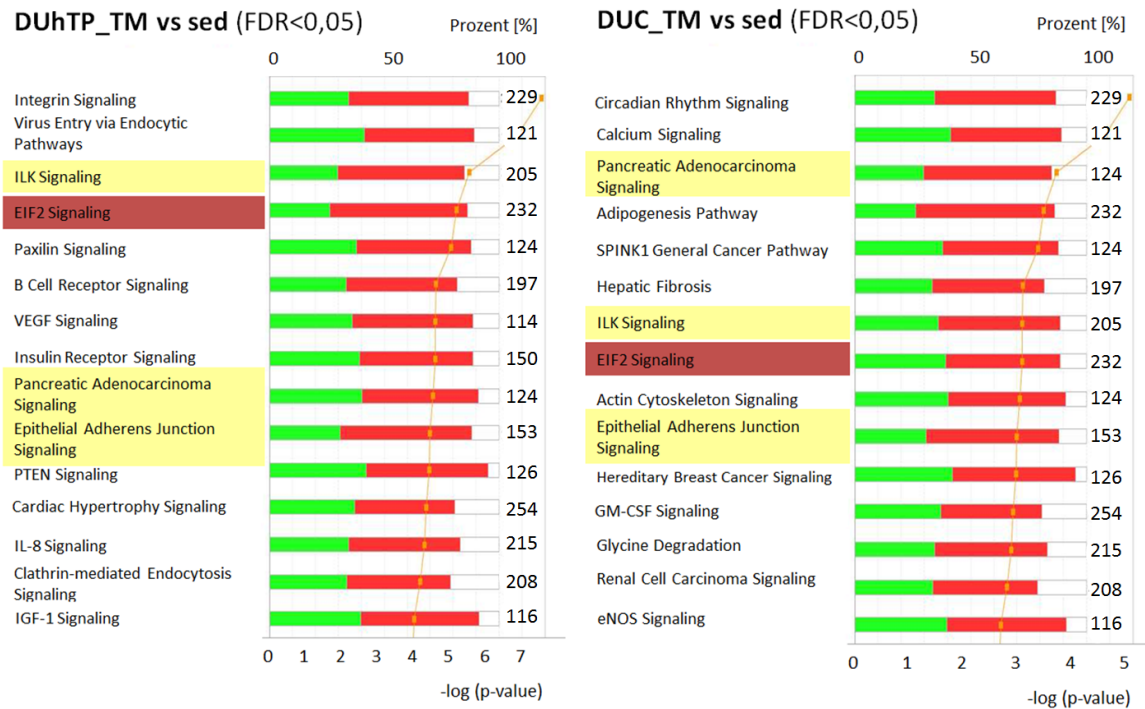


Abb. 13: Auf RNA-Ebene im Muskel modulierte Signalwege in den Trainingsvergleichen. Dargestellt sind die Top 15 der Signalwege, deren Gene unter den DEGs im Vergleich der trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen (DUhTP_TM vs sed) sowie im Vergleich trainierter DUC-Kontrollmäuse mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen (DUC_TM vs sed) im M. rectus femoris mit einer Falscherkennungsrate von $FDR < 0,05$ signifikant überrepräsentiert waren (IPA-Abbildung). Drei Signalwege waren in beiden Vergleichen mit den entsprechenden DEGs assoziiert (gelb hinterlegt). Der EIF2-Signalweg war in allen vier Vergleichen unter den Top 15 Signalwegen vertreten (rot hinterlegt). Die Färbung der Säulen repräsentiert den prozentualen Anteil aller am betrachteten Signalweg beteiligten DEGs, wobei gilt: rot= Hochregulation in den trainierten Individuen, grün=Herunterregulation in den trainierten Individuen gegenüber den untrainierten Individuen der gleichen Mauslinie. Zur Erklärung der verwendeten Abkürzungen und Farben vgl. Abb. 12.

4.5 Regulation der Muskeldifferenzierung

Die mit Muskeldifferenzierung assoziierten Signalwege wurden hinsichtlich ihrer involvierten Gene und Interaktionen mittels IPA untersucht und die differentielle Expression für alle vier Vergleiche dargestellt. Eine Auswahl dieser Gene und ihrer Expressionsdaten für die jeweiligen Vergleiche ist in Tab. 15 (S. 62) dargestellt. Die Auswahl erfolgte anhand der in IPA dargestellten Signalwege, Netzwerke und unter Zuhilfenahme der IPKB.

4.5.1 Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien

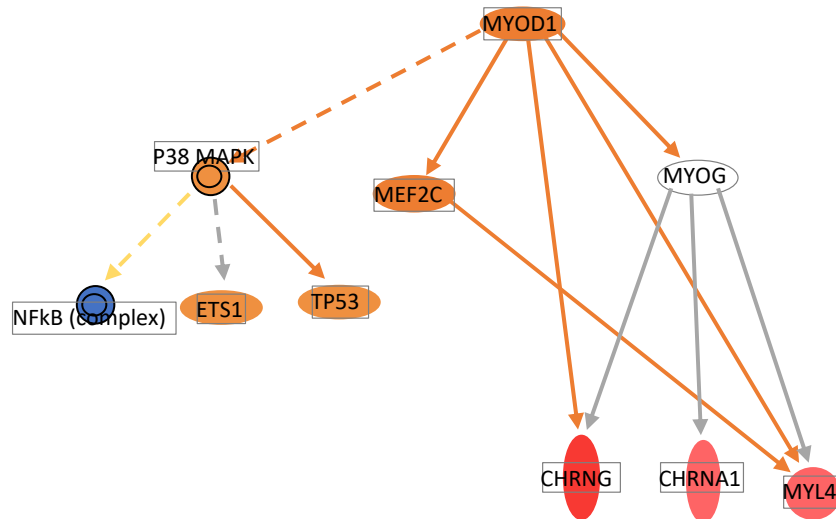
Die Signalwegsanalysen mit IPA zeigten für die Linie der DUC-Kontrollmäuse eine in Folge des Trainings aktivierte Signalkaskade ausgehend vom MRF Myogener Faktor 3 (Myod1) (Abb. 14a; S. 55). Damit verbunden waren signifikant höhere Level von Genen nikotinischer

Ergebnisse

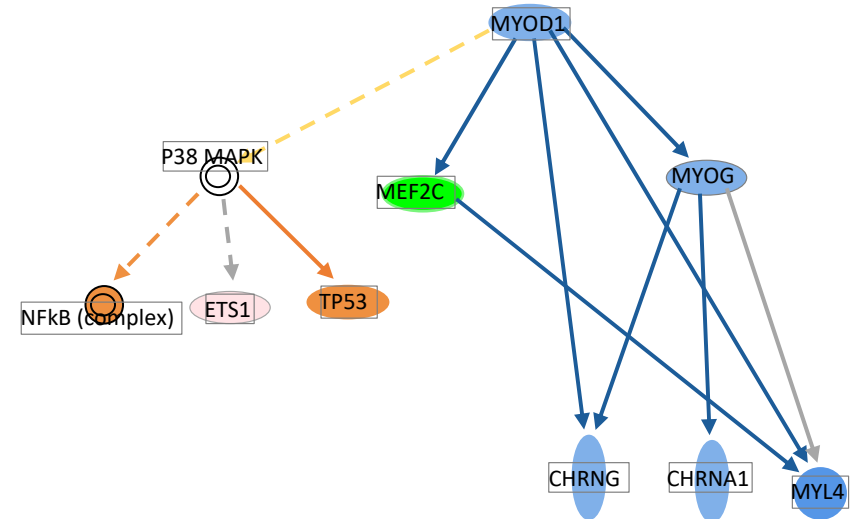
Acetylcholinrezeptoren (nAChR) (*Chrna1*: $\log_2FC=1,1$, $p<0,001$; *Chrng*: $\log_2FC=3,9$, $p<0,001$; *Chrnb1*: $\log_2FC=0,5$, $p<0,001$) sowie des für das Protein Myosin Light Chain codierenden Gens *Myl4* ($\log_2FC=3,3$, $p<0,001$) (*Abb. 14a*, *S. 55*; *Tab. 15*, *S. 62*). Durch die IPA-Funktion „*upstream regulators*“ vorhergesagt höhere muskuläre Expressionslevel im Vergleich trainierter mit untrainierter DUC-Kontrollmäuse zeigten sich ebenfalls bezüglich des MEFs Mef2c (*Abb. 14a*). Zudem zeigten sich in trainierten DUC-Kontrollmäusen zusätzlich höhere Expressionslevel des MRFs Myogenin (*Myog*: $\log_2FC=1,3$; $p<0,001$) sowie des die Myoblastenfusion koordinierenden Proteins Myomaker (*Mymk*: $\log_2FC=5,2$; $p<0,001$) (*Tab. 15*; *DUC_TM vs sed*). Laut IPKB beeinflusst der Transkriptionsfaktor Myod1 zusätzlich die MAP-Kinase p38, sodass IPA auch hier eine Hochregulation annahm. Ein der Kontrolle entgegengesetztes Bild zeigte die Genexpression in trainierten DUhTP-Marathonmäusen: Trainierte DUhTP-Marathonmäuse wiesen hier verglichen mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen signifikant niedrigere Level von Mef2c, sowie relativ ähnliche bis tendenziell verminderte Level von nAChR- und MRF-Genen auf (*Abb. 14b*).

Muskelwachstum und Proteinsynthese werden wesentlich durch den IGF1-Akt-Signalweg reguliert (*Kap. 1.2*). Der NGS-Datensatz zeigte keine signifikanten muskulären Expressionsunterschiede von für Proteine kodierenden Genen dieses Signalweges im Vergleich von DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Laufbandtraining (*Tab. 15*; *S. 62*). Im Vergleich von DUhTP-Marathonmäusen mit und ohne Laufbandtraining zeigte sich trainingsbedingt eine im Mittel signifikant vermehrte Expression von Genen für Forkhead-Box-Proteine (*Foxo1*, *Foxo3*; $p<0,001$) sowie eine signifikant verminderte Expression von für IGF1 (*Igf1*; $\log_2FC= -0,7$; $p<0,001$) und *mammalian target of rapamycin complex 2* (*Rictor*; $\log_2FC= -0,5$; $p=0,005$) kodierenden Genen. Der NGS-Datensatz ergab keinen Hinweis darauf, dass das Laufbandtraining die Expression weiterer Moleküle des IGF1-Akt-Signalweges in der Linie der DUhTP-Marathonmäuse wesentlich beeinflusst ($|\log_2FC|<0,5$; *Tab. 15*).

a) DUC_TM vs sed



b) DUhTP_TM vs sed



Ergebnisse

Abb. 14: Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators Myod1 und seiner Verbindungen zu den (trainingsassoziierten) DEGs im Datensatz modifiziert nach IPKB (Qiagen, IPA; <https://digitalinsights.qiagen.com>). a) Vergleich von DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Belastung und b) Vergleich von DUhTP-Marathonmäusen mit und ohne Belastung (IPA-Abbildung). Im Vergleich der trainierten mit den untrainierten Individuen beider Linien zeigte sich eine vermehrte Expression von Myod1 und nachgeschalteter Moleküle in der Linie der DUC-Kontrollmäuse, nicht aber in der DUhTP-Marathonmaus. Die Farben symbolisieren die Expressionsrichtung. Rot/grün: messbar verstärkte/verringerte Expression in der Trainingsgruppe (FDR<0,05); orange/blau: vorhergesagte Aktivierung/Hemmung. Die Pfeile stellen die Verknüpfung der Moleküle miteinander her, wobei ein gestrichelter Pfeil einen indirekten Effekt auf das nachgeschaltete Molekül symbolisiert. Blau: führt zur Hemmung; gelb: Messergebnisse nicht mit Zustand des nachgeschalteten Moleküls übereinstimmend; grau: kein Effekt vorhergesagt; orange: führt zur Aktivierung. *CHRN*: cholinergic receptor nicotinic subunit; *DUC*: Dummerstorf-Kontrolllinie; *DUhTP*: Dummerstorf high Treadmill Performance; *ETS1*: ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor; *IPKB*: Ingenuity Pathway Analysis Knowledge Base; *MEF2C*: Myocyte-specific Enhancer Factor 2C; *MYOD1*: Myogener Faktor 3; *MYOG*: Myogenin; *MYL4*: Myosin Light Chain 4; *NFkB*: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancers of activated B-cells; *p38MAPK*: p38 Mitogen-Aktivierte Proteinkinase; *TP53*: Tumor Protein P53; *_sed*: ohne Laufbandtraining; *_TM*: mit Laufbandtraining; ○: Gruppe oder Komplex; ○: Transmembranrezeptor; ○: Andere. Die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung liegt vor (Kap. 9.4). Es gilt die CC-BY-Lizenz 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>)

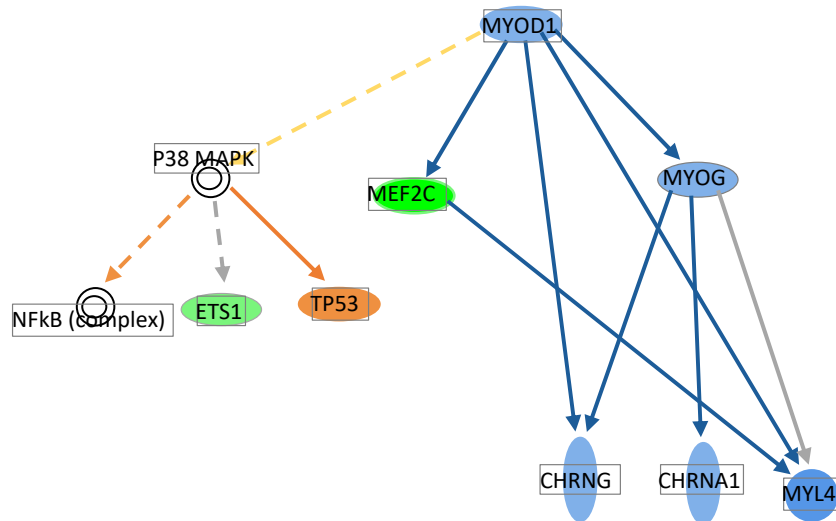
4.5.2 Unterschiede im Vergleich der Mäuse beider Mauslinien

Im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen zeigten DUhTP-Marathonmäuse in den Signalwegsanalysen mit IPA ohne Training tendenziell (*Abb. 15a*; *S. 57*), mit Training signifikant (*Abb. 15b*) niedrigere Level von MRF- und nAChR- Genen sowie von *Mef2c* und *Myl4*: Im Vergleich der trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit trainierten DUC-Kontrollmäusen zeigten *Chrng* ($\log_2FC = -3,6$; $p < 0,001$), *Mef2c* ($\log_2FC = -1,2$; $p < 0,001$) und *Myl4* ($\log_2FC = -2,2$; $p < 0,001$) eine deutliche Expressionsverminderung in den DUhTP-Marathonmäusen. Die Expression von *Mymk* war im Vergleich der trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit trainierten DUC-Kontrollmäusen im Mittel signifikant niedriger ($\log_2FC = -3,9$; $p < 0,001$).

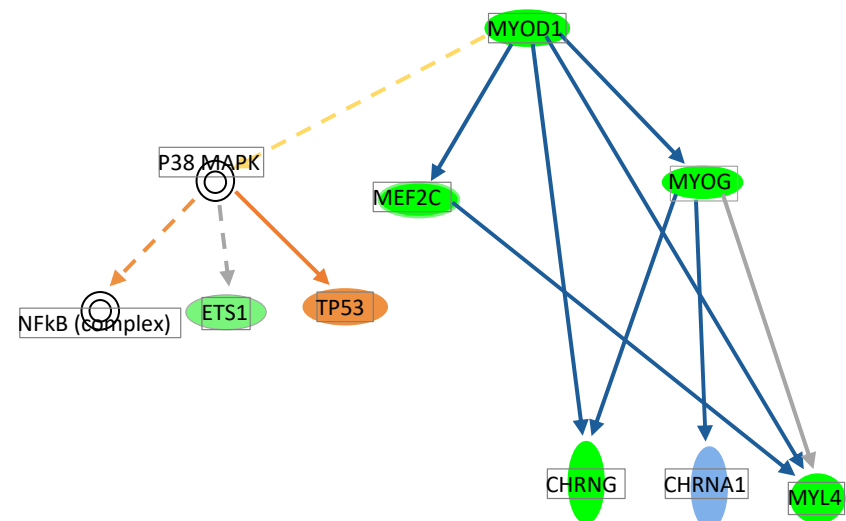
Der NGS-Datensatz ergab darüber hinaus eine im Vergleich zu trainierten DUC-Kontrollmäusen signifikant verminderte RNA-Expression der skelettmuskelspezifischen Methyltransferase *Mettl21c* ($\log_2FC = -1,3$; $p < 0,001$) sowie eine im Mittel tendenziell eher verminderte RNA-Expression von Myosin heavy chain 6 und 7 in trainierten DUhTP-Marathonmäusen (*Tab. 15*; *S. 62*). Die Expression des α -Aktinin 3-Gens (*Actn3*) war in DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen tendenziell ($_sed$) bis signifikant ($_TM$) vermehrt (*Tab. 15*).

Verglichen mit DUC-Kontrollmäusen zeigten DUhTP-Marathonmäuse im Mittel signifikant niedrigere Level von mit dem IGF1-Akt-Signalweg assoziierten IGF1-, PI3K- und IRS-Genen (*Tab. 15*): In besonderem Maße in trainierten DUhTP-Marathonmäusen vermindert waren die Expression von *Igf1* ($\log_2FC = -1,7$; $p < 0,001$) und *Irs1* ($\log_2FC = -1,2$; $p < 0,001$) sowie für Myostatin (*Mstn*: $\log_2FC = -1,2$; $p < 0,001$) und für *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2* (*Igf2bp2*: $\log_2FC = -1,2$; $p < 0,001$) kodierende Gene ($|\log_2FC| > 1$; *Tab. 15*).

a) DUhTP vs DUC_sed



b) DUhTP vs DUC_TM



Ergebnisse

Abb. 15: Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators Myod1 und seiner Verbindungen zu den im Linienvergleich differenziell exprimierten Genen im Datensatz nach IPKB (Qiagen, IPA; <https://digitalinsights.qiagen.com>) a) ohne Laufbandtraining und b) mit Laufbandtraining (IPA-Abbildung). Sowohl mit als auch ohne Laufbandtraining war die Expression der Myod1 nachgeschalteten genregulatorischen Kaskade in den DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen überwiegend geringer. Zur Erklärung der verwendeten Farben und Symbole vgl. Abb. 14. Die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung liegt vor (Kap. 9.4). Es gilt die CC-BY-Lizenz 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>).

Ergebnisse

Zusätzlich ergaben die NGS-Analysen eine gegenüber den DUC-Kontrollmäusen signifikant verminderte Expression von für die 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1 (Pdpk1) sowie den IGF1R kodierenden Genen in den DUhTP-Marathonmäusen (*Tab. 15; S. 62*). Die IGF1R-Proteinexpression hingegen war in DUhTP-Mäusen im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen signifikant höher (*Abb. 16b*).

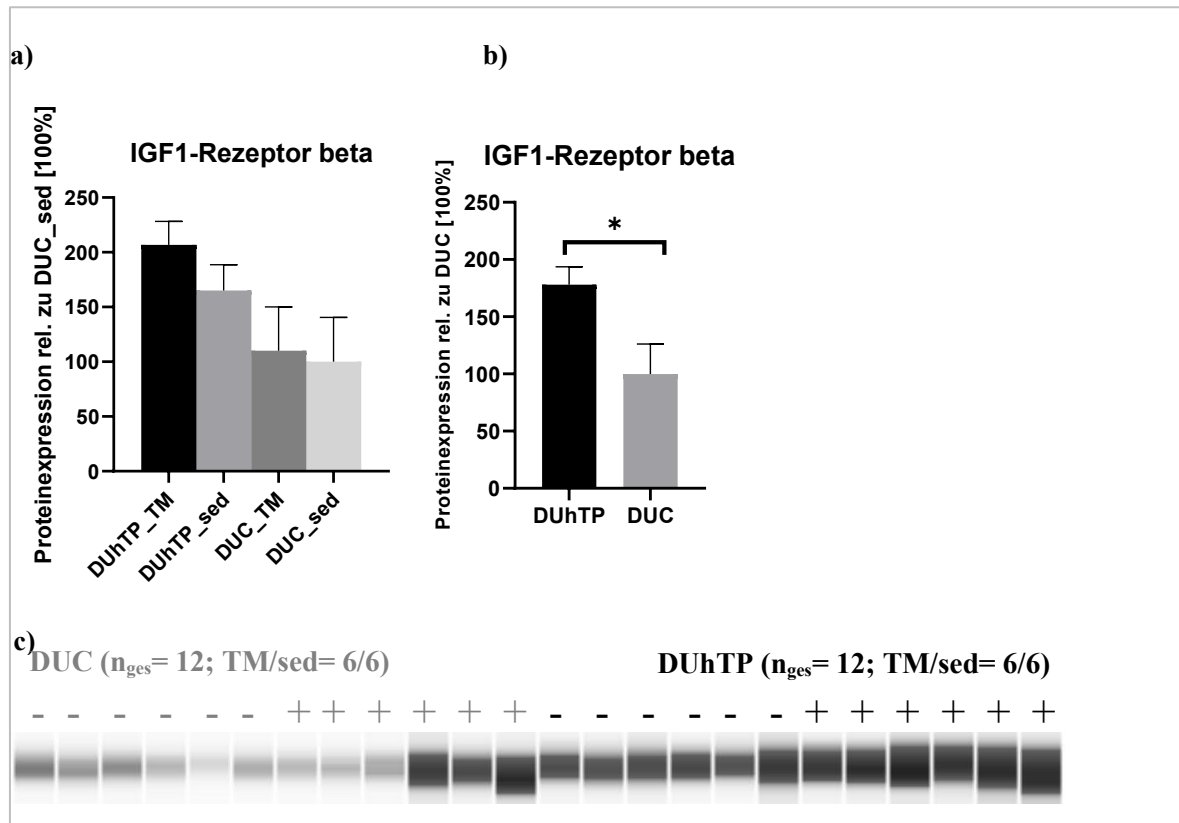


Abb. 16: Expression des Insulin-like growth factor 1 (IGF1) -Rezeptors. Es wurde die Proteinexpression im M. rectus femoris von DUhTP- Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit (TM) und ohne (sed) Training gemessen (a) Betrachtung aller vier Gruppen. (b) Zusammenfassung der trainierten und untrainierten Individuen beider Gruppen. Die Daten wurden mittels Kapillarelektrophorese (Wes) gewonnen (c) und im Verhältnis zu DUC_sed (100 %) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (* $p < 0,05$, Student's t-Test). *_sed*: ohne Laufbandtraining (-); *_TM*: mit Laufbandtraining (+)

Der Vergleich der untersuchten Mäuse beider Linien ohne Training zeigte ein relativ ähnliches Level der für Akt kodierenden Gene *Akt1* und *Akt2*. In trainierten DUhTP-Marathonmäusen war die Expression dieser Gene tendenziell (*Akt1*) bis signifikant (*Akt2*) höher als in DUC-Kontrollmäusen. Auf Proteinebene konnte die im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen vermehrte Proteinexpression des gesamten Akt in DUhTP-Marathonmäusen bestätigt werden (*Abb. 17a; S. 59*). Die Ratio aus Phospho-Akt zu gesamtem Akt hingegen war im Linienvergleich in DUhTP-Mäusen signifikant niedriger (*Abb. 17c*). Zusätzlich ergaben die Proteinanalysen im Vergleich der

Ergebnisse

trainierten mit den untrainierten Individuen beider Linien signifikant höhere Level an Phospho-Akt nach dem Laufbandtraining (Abb. 17b).

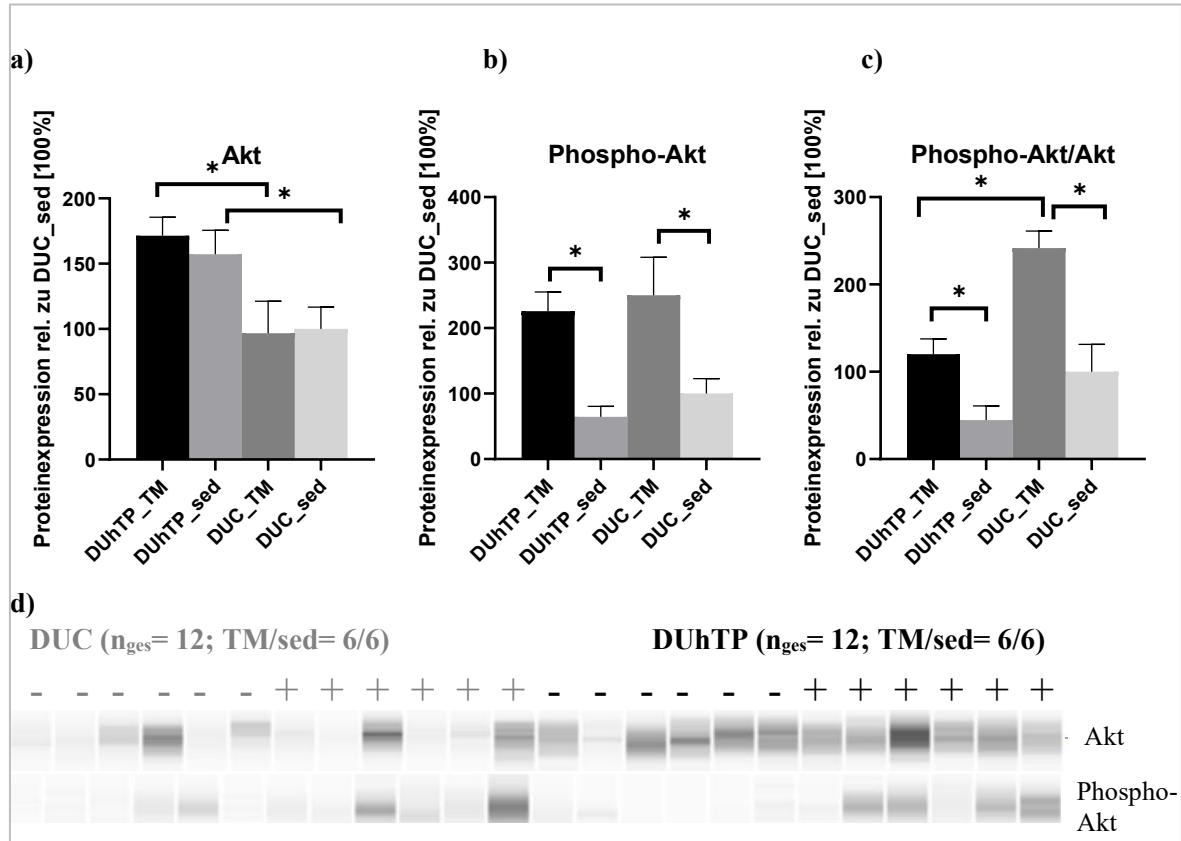


Abb. 17: Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von Akt. Es wurde die Proteinexpression im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen. Die Daten wurden mittels Kapillarelektrophorese (Wes) ermittelt (d) und im Verhältnis zu DUC_sed (100 %) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (* $p < 0,05$, Student's t-Test). *_sed*: ohne Laufbandtraining (-); *_TM*: mit Laufbandtraining (+)

Bei Betrachtung des NGS-Datensatzes ergab sich im Linienvergleich eine im Mittel signifikant verminderte Expression von GSK3 β -, FoxO3- und mTOR-Genen in den untrainierten DUhTP-Marathonmäusen (Tab. 15; S. 62). Der NGS-Datensatz zeigte im Vergleich trainierter DUhTP-Marathonmäuse zu trainierten DUC-Kontrollmäusen in den DUhTP-Marathonmäusen im Mittel signifikant niedrigere Level an PTEN-mRNA ($\log_2FC = -1,1$; $p < 0,001$; Tab. 15). Auf Proteinebene konnte das gegenüber den DUC-Kontrollmäusen verringerte PTEN-Level in den DUhTP-Marathonmäusen nicht bestätigt werden: Signifikant erhöhte Proteinlevel an gesamtem PTEN (Abb. 18a; S. 60) sowie ein tendenziell vermindertes Level der Ratio Phospho-PTEN/PTEN (Abb. 18c) wurden im Muskel von DUhTP-Marathonmäusen gemessen. Der Anteil von phosphoryliertem PTEN war in keiner der untersuchten Gruppen signifikant verschieden (Abb. 18b).

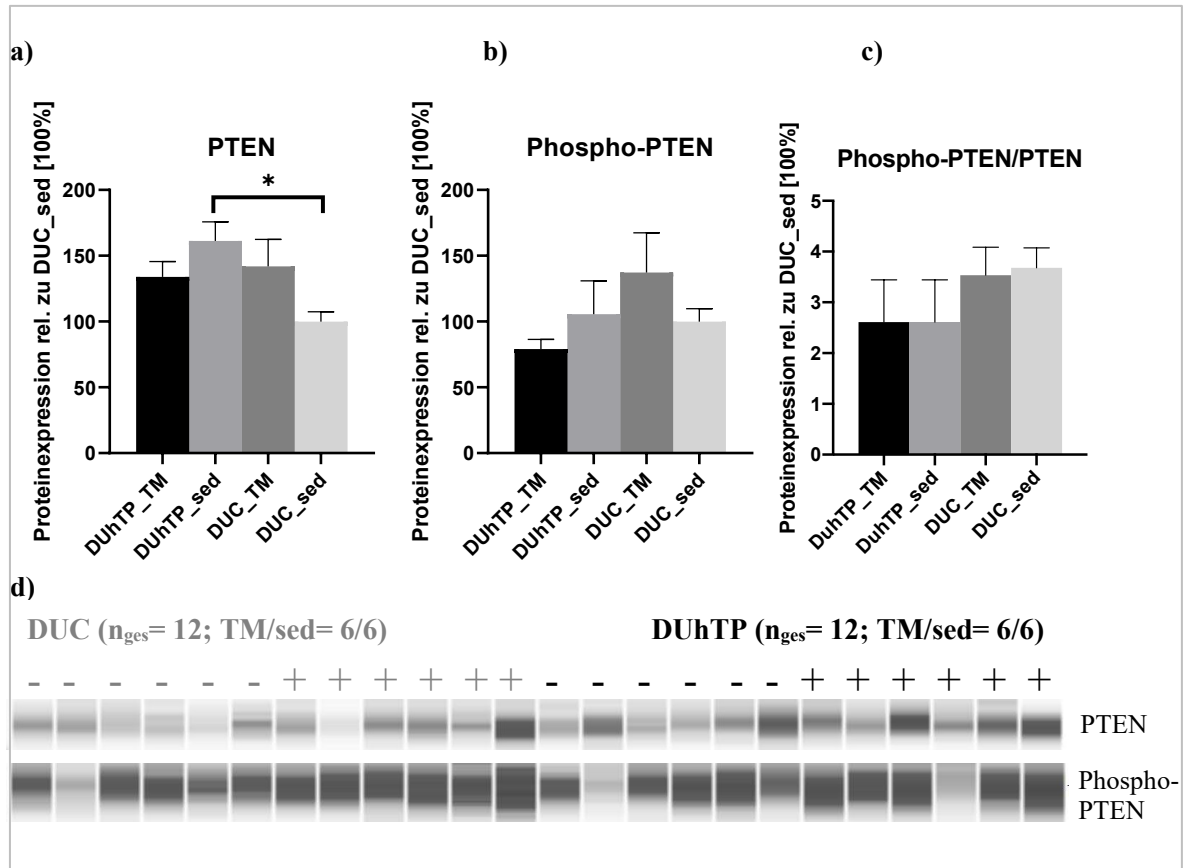


Abb. 18: Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von phosphatase and tensin homolog (PTEN). Es wurde die Proteinexpression im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen. Die Daten wurden mittels Kapillarelektrophorese (Wes) gewonnen (d) und im Verhältnis zu DUC_sed (100 %) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (* $p < 0,05$, Student's t-Test). _sed: ohne Laufbandtraining (-); _TM: mit Laufbandtraining (+)

Der NGS-Datensatz lieferte ein uneinheitliches Bild hinsichtlich der Expression der für die 5'-AMP-aktivierte Proteinkinase AMPK kodierenden Gene im Vergleich der Muskelproben beider Mauslinien (*Prkaa1*, *-a2*, *-b1*, *-g1*, *-g2*, *-g3*; Tab. 15; S. 62). Auf Proteinebene zeigten sich zwischen beiden Linien keine Expressionsunterschiede hinsichtlich des gesamten AMPK-Komplexes (Abb. 19a; S. 61), Phospho-AMPK (Abb. 19b) oder der Ratio Phospho-AMPK/Gesamt-AMPK (Abb. 19c). Trainierte DUC-Kontrollmäuse jedoch wiesen signifikant niedrigere Level von Phospho-AMPK als untrainierte DUC-Kontrollmäuse auf (Abb. 19b).

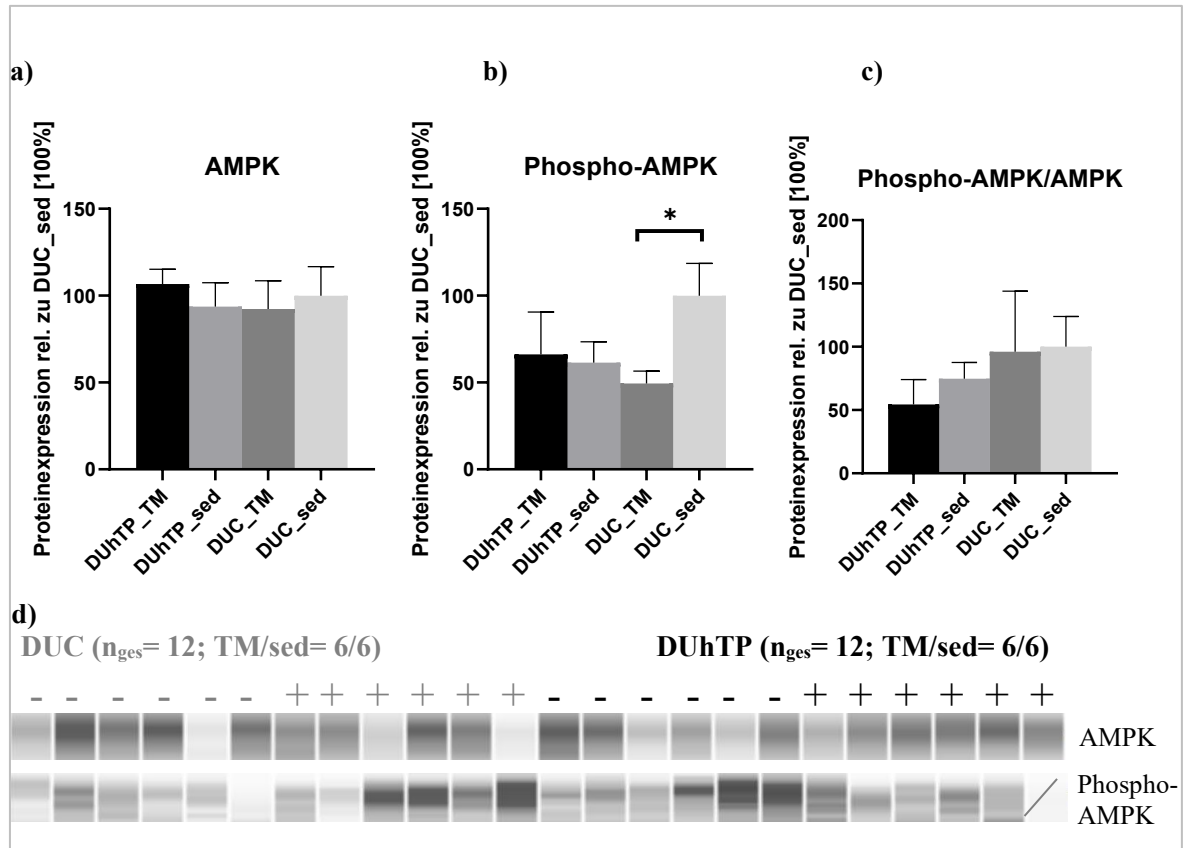


Abb. 19: Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK). Es wurde die Proteinexpression im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen. Die Daten wurden mittels Kapillarelektrophorese (Wes) gewonnen (d) und im Verhältnis zu DUC_sed (100 %) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (* $p < 0,05$, Student's t-Test). *_sed*: ohne Laufbandtraining (-); *_TM*: mit Laufbandtraining (+)

Im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen zeigte der NGS-Datensatz sowohl mit als auch ohne Training eine im Muskel der DUhTP-Marathonmäuse vermehrte RNA-Expression von Genen der IGF-Bindungsproteine (*Igfbp3, 4, 6, 7*; Tab. 15; S. 62).

Tab. 15: Vergleich der Expression mit Muskeldifferenzierung und IGF1-Akt-Signalweg assoziierter Gene

Funktion ¹	DUhTPvsDUC_sed		DUhTPvsDUC_TM		DUhTP_TM vs sed		DUC_TM vs sed			
	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert		
Bestandteile des IGF1-Akt-Signalweges	Akt1	0,1	0,251	0,2	0,067	0,2	0,152	0,1	0,456	
	Akt2	0,1	0,370	0,3	0,004	0,1	0,096	0,0	0,750	
	Foxo1	-0,3	0,132	0,6	0,007	0,9	<0,001	0,0	0,999	
	Foxo3	-0,4	<0,001	0,2	0,052	0,6	<0,001	0,0	0,893	
	Gsk3b	-0,7	<0,001	-0,6	<0,001	-0,1	0,151	-0,2	0,063	
	Igf1	-0,9	<0,001	-1,7	<0,001	-0,7	<0,001	0,1	0,579	
	Igf1r	-0,5	<0,001	-0,3	0,023	0,0	0,814	-0,2	0,154	
	Irs1	-0,8	<0,001	-1,2	<0,001	-0,4	0,014	0,0	0,882	
	Irs2	-1,1	0,015	-0,3	0,465	0,6	0,224	-0,2	0,603	
	Mtor	-0,3	0,001	0,0	0,921	0,2	0,053	-0,1	0,164	
	Pdpk1	-0,8	<0,001	-0,8	<0,001	0,0	0,921	0,0	0,864	
	Pik3ca	-0,5	<0,001	-0,6	<0,001	-0,4	<0,001	-0,3	0,002	
	Pik3cb	-0,4	0,003	-0,5	<0,001	-0,1	0,335	-0,0	0,970	
	Rictor	-0,6	0,001	-0,8	<0,001	-0,5	0,005	-0,3	0,123	
	Rptor	-0,3	0,002	-0,1	0,504	0,3	0,004	0,0	0,591	
	Modulatoren des IGF1-Akt - Signalweges	Igf2bp2	-0,5	0,166	-1,2	<0,001	-0,8	0,019	-0,1	0,788
Igfbp3		0,4	0,022	0,5	0,002	-0,3	0,097	-0,4	0,015	
Igfbp4		0,2	0,045	0,5	<0,001	0,3	0,003	0,1	0,531	
Igfbp6		0,2	0,183	0,6	<0,001	0,4	0,005	0,0	0,752	
Igfbp7		0,2	0,074	0,3	0,002	0,1	0,157	0,0	0,882	
Mstn		-1,2	<0,001	-1,2	<0,001	-0,1	0,807	0,0	0,961	
Prkaa1		-0,7	<0,001	-0,8	<0,001	-0,3	0,016	-0,1	0,328	
Prkaa2		-0,7	<0,001	-0,9	<0,001	-0,3	0,012	-0,1	0,881	
Prkab1		0,4	0,003	0,3	0,009	-0,1	0,517	0,0	0,474	
Prkag1		0,4	<0,001	0,5	<0,001	0,1	0,189	0,0	0,774	
Prkag2		0,2	0,080	0,2	0,120	0,0	0,722	0,1	0,585	
Prkag3		0,3	0,089	0,0	0,806	0,0	0,954	0,3	0,059	
Pten		-0,7	<0,001	-1,1	<0,001	-0,4	<0,001	0,0	0,868	
Muskelfaserspezifische Proteine		Actn3	0,2	0,085	0,4	0,003	0,3	0,041	0,1	0,401
		Mettl21c	-0,5	0,031	-1,3	<0,001	-0,7	0,003	0,2	0,382
		Myh6	0,1	0,923	-0,2	0,781	0,0	0,992	0,3	0,700
	Myh7	-0,3	0,746	-0,6	0,480	0,2	0,818	0,5	0,540	
Regulation der Myogenese	Myl4	1,0	0,042	-2,2	<0,001	0,0	0,984	3,3	<0,001	
	Chrna1	0,4	0,175	-0,5	0,078	0,1	0,636	1,1	<0,001	
	Chrnb1	0,0	0,778	-0,3	0,028	0,2	0,213	0,5	<0,001	
	Chrne	0,3	0,031	0,1	0,480	0,1	0,669	0,3	0,061	
	Chrng	-0,4	0,607	-3,6	<0,001	0,6	0,416	3,9	<0,001	
	Mef2c	-0,6	<0,001	-1,2	<0,001	-0,6	<0,001	0,0	0,808	
	Mymk	-0,2	0,799	-3,9	<0,001	1,5	0,072	5,2	<0,001	
	Myod1	0,0	0,965	-0,6	0,004	0,1	0,717	0,7	0,001	
	Myog	-0,1	0,769	-0,9	0,008	0,5	0,134	1,3	<0,001	

Ergebnisse

log₂ Fold Change und p-Werte in fett, falls p<0,05; ¹ von <https://www.uniprot.org>

4.6 Mitochondrialer Metabolismus

Die Muskelkontraktion ist ein energieverbrauchender Prozess und von der Produktion von ATP und anderen Energieäquivalenten abhängig. Zur Bereitstellung von Energie werden zunächst Glukose und dann Lipide genutzt (*Kap. 1.3*). Mit Hilfe der vergleichenden NGS-Analyse von Muskeln aus DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen konnten differentiell exprimierte Transkripte verschiedener Stoffwechselwege identifiziert werden (*Tab. 17, S. 69*).

4.6.1 Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien

In beiden Mauslinien, DUhTP-Marathonmaus und DUC-Kontrollmaus, ergab sich im NGS-Datensatz kein Hinweis darauf, dass Laufbandtraining die Expression von mit dem mitochondrialen Stoffwechsel assoziierten Genen wesentlich beeinflusst ($|\log_2FC| < 0,5$; *Tab. 17*). Einzig das Entkopplungsprotein 2 (UCP2) wurde auf mRNA-Ebene im Vergleich der trainierten zu untrainierten Individuen in beiden Mauslinien signifikant vermehrt exprimiert.

Auf Proteinebene zeigten sich im Mittel signifikant verminderte Level von membranösen Glukosetransportern 4 (GLUT4) in trainierten DUC-Kontrollmäusen im Vergleich zu untrainierten DUC-Kontrollmäusen (*Abb. 20; S. 64*). Auf RNA-Ebene konnten diese jedoch nicht gesehen werden (*Tab. 17*). Im Vergleich trainierter DUhTP-Marathonmäuse mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen zeigte sich in den DUhTP-Marathonmäusen ein im Mittel signifikant erhöhtes Level an PGC-1 α im NGS-Datensatz ($\log_2FC = 1,3$; $p < 0,001$).

4.6.2 Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien

Die Aufnahme von Glukose in den Muskel erfolgt unter anderem durch die Glukosetransporter GLUT1 (Slc2a1, konstitutiv) und GLUT4 (Slc2a4, insulinabhängig). Im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen zeigten DUhTP-Marathonmäuse im Mittel sowohl mit als auch ohne Training signifikant höhere Level von GLUT4- und ähnliche Level von GLUT1-Transkripten (*Tab. 17*). Auf Proteinebene konnte der in den NGS-Daten gesehene Expressionsunterschied zwischen beiden Linien nicht bestätigt werden (*Abb. 20a, b*), jedoch zeigten trainierte DUC-Kontrollmäuse gegenüber untrainierten DUC-Kontrollmäusen signifikant niedrigere Level von membranösem GLUT4 (*Abb. 20b*).

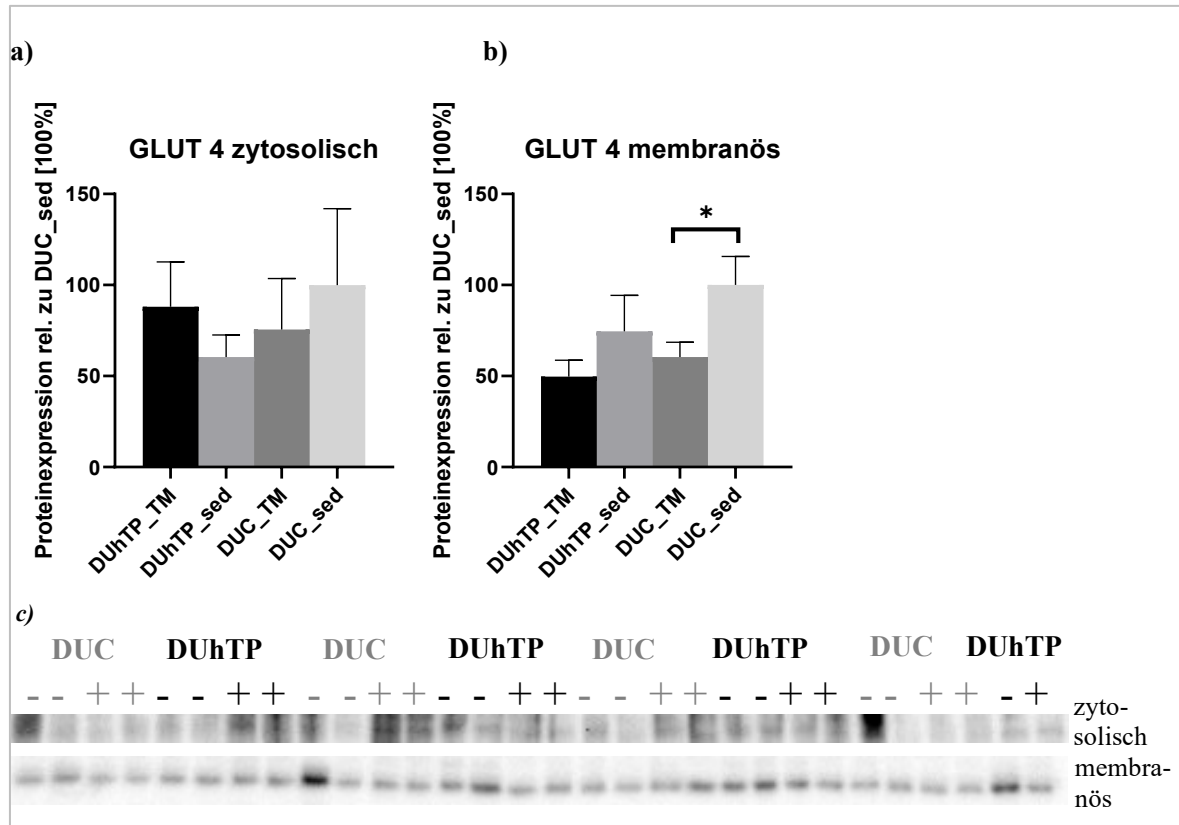


Abb. 20: Proteinkonzentration von zytosolischem (a) und membranösem (b) Glukosetransporter GLUT4. Es wurde die Proteinexpression im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen. Die Daten wurden mittels Western Blot gewonnen (c) und im Verhältnis zu DUC_sed (100 %) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (* $p < 0,05$, Student's t-Test). sed: ohne Laufbandtraining (-); TM: mit Laufbandtraining (+); DUC ($n_{ges}=16$; TM = 8; sed = 8), DUhTP ($n_{ges}=14$; TM = 7; sed = 7)

Die Glykolyse wird in ihrer Geschwindigkeit durch das Enzym Phosphofruktokinase 1 (PFKM) bestimmt. Im Vergleich beider Mauslinien ohne Training ergaben sich bei Betrachtung des NGS-Datensatzes relativ ähnliche Level, mit Training jedoch signifikant höhere Level von PFKM in der DUhTP-Marathonmaus (Tab. 17; S. 69). Der NGS-Datensatz zeigte darüber hinaus gegenüber den DUC-Kontrollmäusen signifikant erhöhte Expressionslevel von Pyruvat-Kinase-, Pyruvat-Dehydrogenase- sowie Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Genen in der DUhTP-Linie (Tab. 17). Die Enzymaktivitätsmessung der muskulären LDH zeigte keine Unterschiede im Vergleich der untrainierten Individuen beider Linien, wohl aber im Vergleich der trainierten Individuen miteinander: Trainierte DUC-Kontrollmäuse wiesen gegenüber DUhTP-Marathonmäusen eine erhöhte LDH-Aktivität auf (Abb. 21; S. 65).

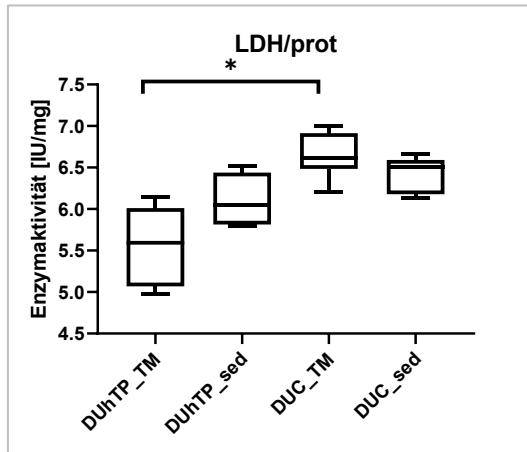


Abb. 21: Spezifische Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase. Es wurde die Enzymaktivität im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen und zur Gesamtproteinmenge im M. rectus femoris normiert (* $p < 0,05$, Student's t-Test). *_sed*: ohne Laufbandtraining; *_TM*: mit Laufbandtraining. $n = 7$ (je Gruppe)

Um eine schnelle Energiebereitstellung zu gewährleisten, erfolgt bei Belastung die initiale ATP-Regeneration über die Kreatinphosphatspeicher (*Kap. 1.3*). Erforderlich dafür ist das Enzym Kreatin-Kinase (CK), das im Muskel durch das Gen *Ckm* kodiert wird. Im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen zeigten DUhTP-Marathonmäuse sowohl mit als auch ohne Training im Mittel signifikant höhere Level von *Ckm* (*Tab. 17; S. 69*). Auf Ebene der Enzymaktivität konnte ein Linienunterschied nicht bestätigt werden (*Abb. 22*).

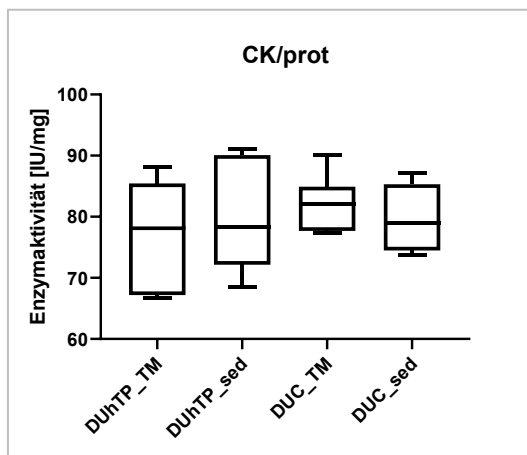


Abb. 22: Spezifische Enzymaktivität der Kreatin-Kinase. Es wurde die Enzymaktivität im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen und zur Gesamtproteinmenge im M. rectus femoris normiert. *_sed*: ohne Laufbandtraining; *_TM*: mit Laufbandtraining. Abgebildet sind Minimum und Maximum, Median sowie oberes und unteres Quartil. $n = 7$ (je Gruppe)

Um eine längerfristige Muskelaktivität zu ermöglichen, müssen weitere energieliefernde Prozesse wie z.B. die aerobe Glykolyse oder der Fettsäureabbau induziert werden (*Kap. 1.4*). Der Abbau von Fettsäuren erfolgt im Rahmen der β -Oxidation in den Mitochondrien (*Kap. 1.6*). Der NGS-Datensatz ergab im Vergleich beider Linien miteinander eine signifikant erhöhte Expression von Genen des Fettsäureabbaus in der DUhTP-Mauslinie (Acyl-CoA-Dehydrogenase: *Acadl*, *Acadvl*; Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase: *Hadh*; *Tab. 17*; *S. 69*).

Mittels der NGS-Analysen konnten zusätzlich differentiell exprimierte Transkripte von Citratzyklus, Glukoneogenese, Malat-Aspartat- sowie Glycerophosphatshuttle im Linienvergleich detektiert werden (*Tab. 17*). Im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen zeigten DUhTP-Marathonmäuse im Mittel signifikant höhere Level dieser Transkripte (*Tab. 17*). Dazu gehörte auch eine gegenüber den DUC-Kontrollmäusen vermehrte Expression der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) in der DUhTP-Marathonmauslinie. Die Aktivitätsmessungen der IDH im Muskel spiegelten die Ergebnisse der NGS-Analysen wider (*Abb. 23*): Sowohl im Vergleich der trainierten als auch der untrainierten Individuen beider Linien miteinander war die Aktivität der muskulären IDH in der DUhTP-Marathonmauslinie signifikant erhöht.

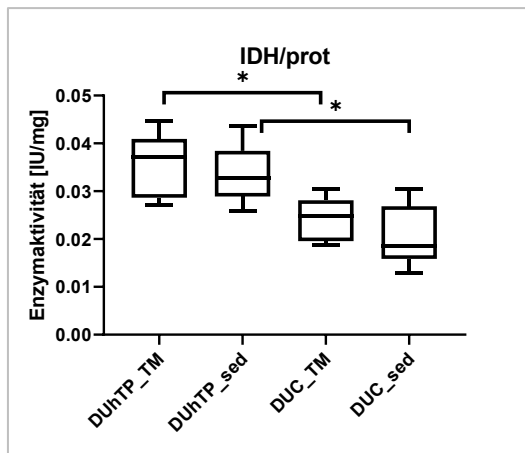


Abb. 23: Spezifische Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase. Es wurde die Enzymaktivität im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen und zur Gesamtproteinmenge im M. rectus femoris normiert. (* $p < 0,05$, Student's t-Test). *_sed*: ohne Laufbandtraining; *_TM*: mit Laufbandtraining. $n = 7$ (je Gruppe)

Die Atmungskette stellt die Endstrecke des gesamten oxidativen Stoffwechsels dar. Hier werden die Elektronen der im gesamten Stoffwechsel entstandenen reduzierten Reduktionsäquivalente abgegeben und für die Energieerzeugung in Form von ATP genutzt (*Kap. 1.6*). Bereits in der Signalweganalyse mit IPA fiel im Vergleich der DUhTP-Marathonmäuse mit den DUC-Kontrollmäusen eine Überrepräsentation von DEGs der oxidativen Phosphorylierung auf (*Abb. 12*; *S. 52*). Wie in *Abb. 24* (*S. 68*) am Beispiel des Vergleiches der trainierten DUhTP-Marathonmäuse

Ergebnisse

mit den trainierten DUC-Kontrollmäusen dargestellt, waren im Mittel alle Komplexe der Atmungskette in den untersuchten DUhTP-Marathonmäusen höher exprimiert (in Rot dargestellt). Um die Regulation der Atmungskette auf RNA-Ebene besser beurteilen zu können, wurden alle Gene der Atmungskette, die im NGS-Datensatz enthalten waren, ausgewählt, gezählt und den einzelnen Komplexen zugeordnet (Tab. 16). Für Komplex I konnten so insgesamt 40 sequenzierte Gene nachgewiesen werden, von denen 23 Gene in den untrainierten DUhTP-Marathonmäuse verglichen mit den untrainierten DUC-Kontrollmäusen höher ($\log_2FC \geq 0,5$), 2 Gene niedriger ($\log_2FC \leq -0,5$) und 15 Gene in den Mäusen beider Linien tendenziell gleich ($|\log_2FC| < 0,5$) exprimiert waren (Tab. 16a). Im Vergleich der Mäuse beider Linien unter Trainingseinfluss (Tab. 16b) zeigte sich eine ähnliche Verteilung in den Abundanzen der mRNA-Transkripte des Komplexes I. Auch die anderen Komplexe der Atmungskette sowie die ATP-Synthase waren in der DUhTP-Marathonmauslinie im Vergleich zur Kontrolle sowohl mit als auch ohne Training vermehrt exprimiert (Tab. 16a, b). Im Vergleich von trainierten mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen sowie im Vergleich von trainierten mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen zeigten sich im Mittel kaum Unterschiede (Tab. 16c, d)

Tab. 16: Expressionsunterschiede von Gentranskripten, die für Proteine der Atmungskette kodieren

Atmungsketten-Komplex	Anzahl [n] sequenzierter Gene	a) DUhTP vs DUC_sed			b) DUhTP vs DUC_TM			c) DUhTP_TM vs sed			d) DUC_TM vs sed		
		↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
I	40	23	2	15	26	3	11	0	3	37	0	0	40
II	5	3	0	2	3	0	2	0	0	5	0	0	5
III	7	5	0	2	5	0	2	0	0	7	0	0	7
IV	13	10	2	1	10	2	1	0	2	11	0	0	13
ATP-Synthase	13	8	0	5	10	0	3	0	0	13	0	0	13

Anzahl aller im Muskel für Proteine der Atmungskette kodierender (mittels RNASeq ermittelter) Gentranskripte sowie die anhand des $\log_2(\text{Fold Change})$ ermittelte Richtung der Veränderung. Sowohl ohne (a) als auch mit (b) Training war die Mehrheit aller sequenzierten Transkripte in den DUhTP-Marathonmäusen verglichen mit den DUC-Kontrollmäusen tendenziell höher exprimiert. Im Vergleich der trainierten mit den untrainierten Individuen ergaben sich in den Gruppen beider Mauslinien überwiegend keine Veränderung (c, d). *DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance; FC: Fold Change; _sed: ohne Laufbandtraining; _TM: mit Laufbandtraining; ↑: höher exprimiert ($\log_2FC \geq 0,5$); ↓: vermindert exprimiert ($\log_2FC \leq -0,5$); =: kein deutlicher Unterschied ($|\log_2FC| < 0,5$)*

Verglichen mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen wiesen untrainierte DUhTP-Marathonmäuse signifikant niedrigere Level von für den Leptinrezeptor (*Lepr*: $\log_2FC = -1,0$, $p < 0,001$) und PGC-1 α (*Pparg1a*: $\log_2FC = -1,4$, $p < 0,001$) kodierenden Genen auf (Tab. 17; S. 69).

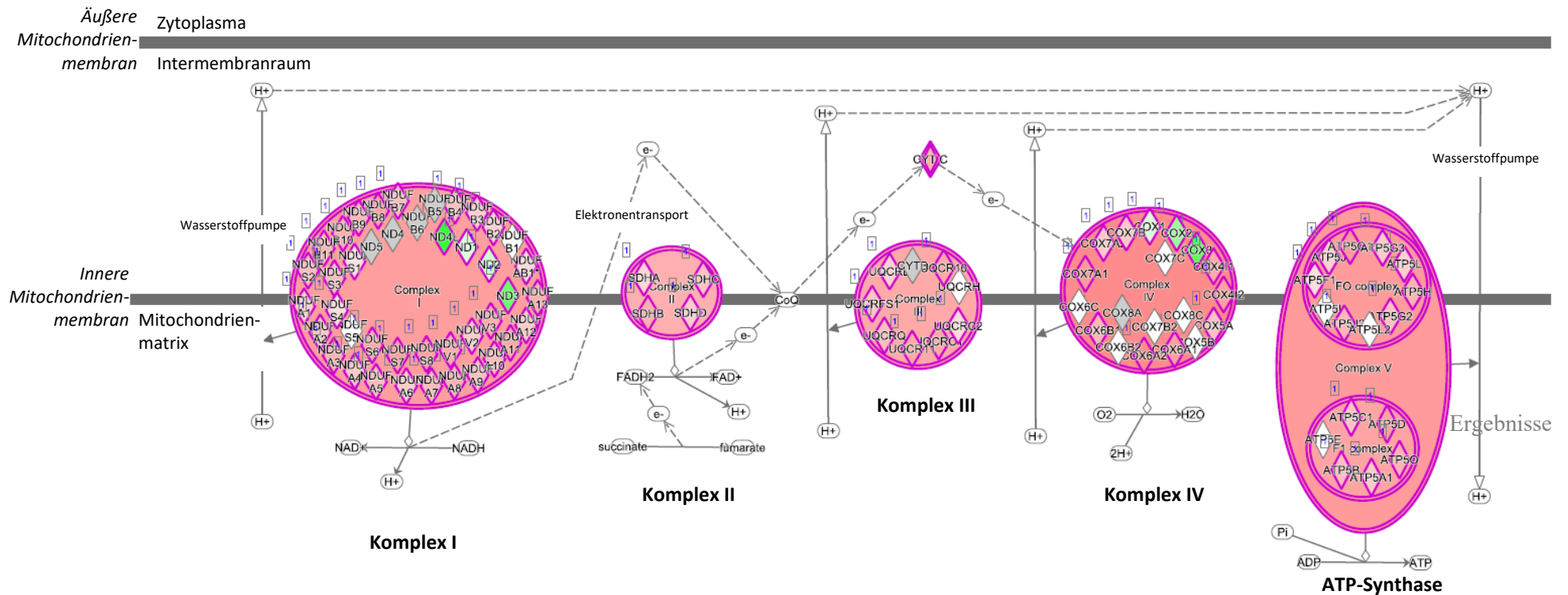


Abb. 24: Schematische Darstellung der mit der Oxidativen Phosphorylierung/Atmungskette ermittelten DEGs im Vergleich trainierter DUhTP- und trainierter DUC-Mäuse (Qiagen, IPA; <https://digitalinsights.qiagen.com>). Verglichen wurden trainierte (TM) DUhTP-Marathonmäuse mit trainierten DUC-Kontrollmäusen. (DUhTP vs DUC_{TM}). Die Größe der einzelnen Komplexe ist vom Analyseprogramm vorgegeben. rot: verstärkte Expression in der DUhTP-Linie; grün: verringerte Expression in der DUhTP-Linie. DUC: Dummerstorf-Kontrolllinie; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance; 1: weitere Verknüpfungen verfügbar

Tab. 17: Vergleich der Expression von Komponenten des mitochondrialen Metabolismus

Funktion ¹		DUhTPvsDUC_sed		DUhTPvsDUC_TM		DUhTP_TMvssed		DUC_TMvssed	
		log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert
<i>Glukosetransporter</i>	Slc2a1	0,0	0,825	0,1	0,559	0,4	0,035	0,2	0,197
	Slc2a4	0,2	0,013	0,4	<0,001	0,3	0,003	0,1	0,141
<i>Glykolyse</i>	Pfkm	0,2	0,143	0,3	0,004	0,2	0,036	0,1	0,493
	Ldha	0,4	<0,001	0,4	<0,001	0,1	0,400	0,1	0,296
	Ldhb	0,5	0,115	0,9	0,008	-0,1	0,803	-0,5	0,175
	Pdhb	0,4	<0,001	0,4	<0,001	0,0	0,880	0,0	0,987
	Pkm	0,3	0,003	0,4	<0,001	0,2	0,089	0,1	0,402
<i>Fettsäureabbau</i>	Acadl	0,3	0,067	0,8	<0,001	0,1	0,702	-0,4	0,018
	Acadv1	0,6	<0,001	0,8	<0,001	0,1	0,366	-0,2	0,273
	Hadh	0,5	<0,001	0,7	<0,001	0,0	0,891	-0,2	0,082
<i>ATP-Speicherung/Bereitstellung</i>	Ckm	0,5	<0,001	0,7	<0,001	0,2	0,081	0,0	0,921
<i>Malat-Aspartat-Shuttle</i>	Mdh1	0,4	0,004	0,5	<0,001	0,1	0,352	0,0	0,998
	Mdh2	0,5	<0,001	0,8	<0,001	0,2	0,034	-0,1	0,255
<i>Glycerophosphatshuttle</i>	Gpd1	0,4	0,006	0,5	0,001	0,1	0,518	0,0	0,849
	Gpd2	-0,2	0,149	-0,1	0,380	-0,1	0,626	-0,2	0,294
<i>Citratzyklus</i>	Cs	0,3	<0,001	0,5	<0,001	0,1	0,154	0,0	0,635
	Dld	0,0	0,955	-0,3	<0,001	-0,3	0,001	-0,1	0,496
	Dlst	0,3	0,008	0,4	<0,001	0,2	0,066	0,0	0,857
	Idh3b	0,4	<0,001	0,5	<0,001	0,0	0,947	-0,1	0,200
	Idh3g	0,5	<0,001	0,6	<0,001	0,0	0,674	-0,1	0,251
	Ogdh	0,1	0,460	0,4	<0,001	0,2	0,008	-0,1	0,184
<i>Atmungskette/OXPHOS</i>	Atp5a1	0,3	0,002	0,5	<0,001	0,1	0,260	-0,1	0,480
	Cox5a	0,5	<0,001	0,5	<0,001	0,0	0,974	0,0	0,602
	Ndufa9	0,5	<0,001	0,6	<0,001	0,1	0,548	0,0	0,699
	Sdhc	0,6	<0,001	0,5	<0,001	0,0	0,963	0,1	0,273
	Uqcrc1	0,6	<0,001	0,8	<0,001	0,1	0,198	-0,1	0,491
	Ucp2	0,2	0,383	0,4	0,073	0,8	<0,001	0,6	0,010
	Ucp3	0,1	0,731	0,3	0,083	0,3	0,103	0,0	0,807
<i>Glukoneogenese</i>	Fpb2	0,6	0,007	0,5	0,030	0,3	0,205	0,4	0,070
	G6pc3	0,5	<0,001	0,4	<0,001	0,0	0,671	0,1	0,326
	Pck1	0,3	0,730	0,0	0,988	-1,3	0,096	-1,0	0,188
	Pck2	0,6	0,001	0,6	<0,001	0,1	0,702	0,1	0,644
	Pex	0,2	0,409	0,0	0,958	-0,1	0,509	0,0	0,910
<i>Transkriptionsfaktoren</i>	Ppargc1a	-1,4	<0,001	-0,5	0,060	1,3	<0,001	0,4	0,111
<i>Rezeptoren</i>	Lepr	-1,0	<0,001	-1,1	<0,001	0,0	0,979	0,1	0,509

Ergebnisse

log₂ Fold Change und p-Werte in fett, falls p<0,05; ¹ von <https://www.uniprot.org>

4.7 Komponenten der Abwehr oxidativen Stresses

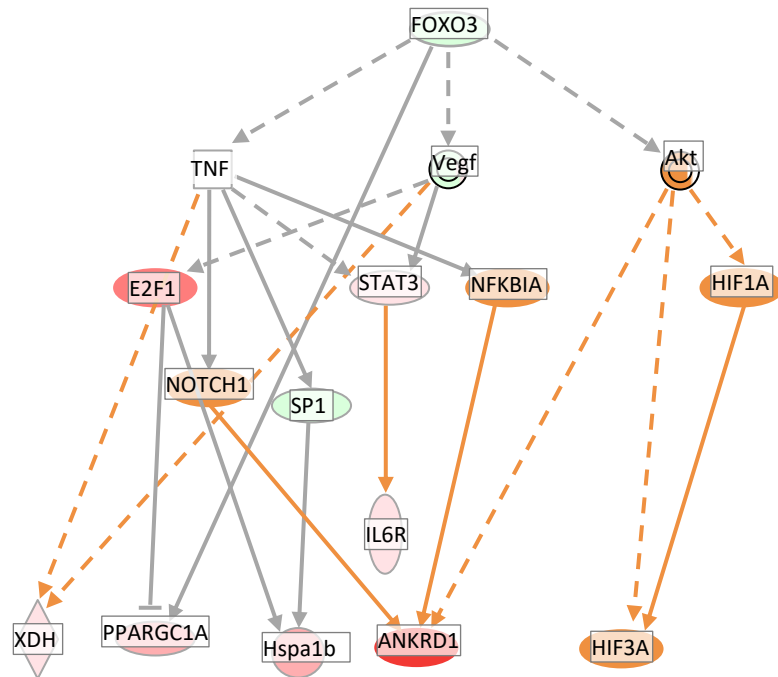
Körperliche Aktivität resultiert in der Bildung freier Radikale (*Kap. 1.5*). Die Bildung dieser Radikale erfolgt sowohl endogen als auch exogen induziert und erfordert umfangreiche antioxidative Mechanismen zur Einschränkung ihrer negativen Auswirkungen. Mit Hilfe der vergleichenden NGS-Analyse der Muskeln von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen konnten mit oxidativem Stress assoziierte differentiell exprimierte Gene identifiziert werden (*Tab. 18, S. 76*).

4.7.1 Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien

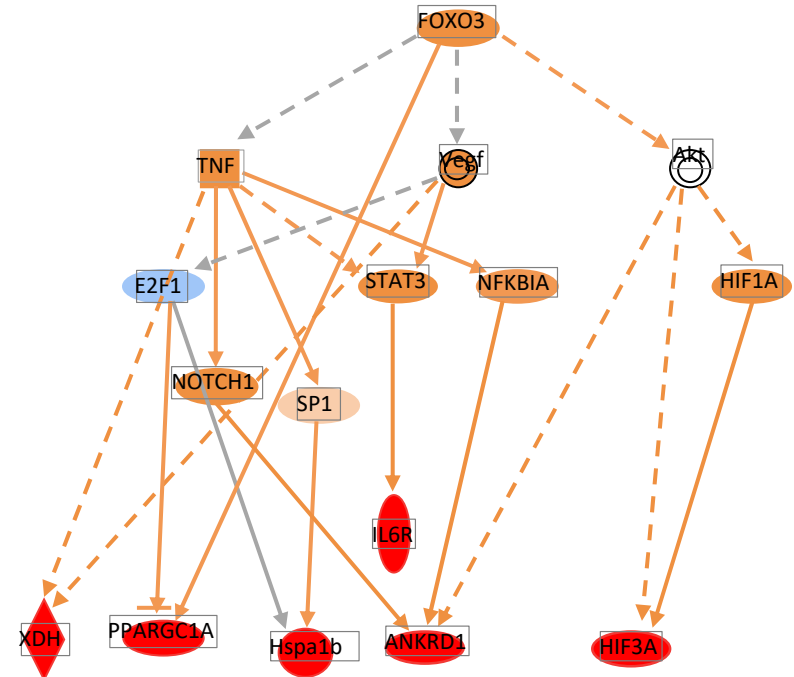
Im Vergleich trainierter mit untrainierten Individuen der DUhTP-Marathonmauslinie ergaben sich im Mittel in der Gruppe mit Training signifikant höhere Level des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein O3 (FoxO3) (*Tab. 18*). Verglichen mit den untrainierten DUhTP-Marathonmäusen konnten im Muskel der trainierten DUhTP-Marathonmäuse durch FoxO3 regulierte Gene ebenfalls vermehrt nachgewiesen werden (*Abb. 25b; S. 71*, rot markiert). Es zeigte sich außerdem eine deutlich vermehrte Expression von für HSP70 kodierenden Genen (*Hspa1a*: $\log_2FC=2,3$; $p=0,003$; *Hspa1b*: $\log_2FC=2,3$; $p=0,017$) sowie Genen für die Transkriptionsfaktoren Hypoxie-induzierter Faktor und Ankyrin Repeat Domain 1 (*Hif3a*: $\log_2FC=1,1$; $p<0,001$; *Ankrd1*: $\log_2FC=1,4$; $p=0,002$; *Tab. 18*) bei trainierten DUhTP-Marathonmäusen.

In trainierten DUC-Kontrollmäusen bot sich ein ähnliches Bild bezüglich der FoxO3-regulierten Gene. Die FoxO3-Expression war jedoch gegenüber den untrainierten Individuen vermindert (*Abb. 25a*). Das Ausmaß der in IPA über die Farbintensität kodierten Expressionsunterschiede war im Vergleich der trainierten mit untrainierten DUC-Kontrollmäuse weniger ausgeprägt als innerhalb der Linie DUhTP (*Abb. 25a, b*). Unter Berücksichtigung des NGS-Datensatzes ergab sich kein Hinweis darauf, dass Laufbandtraining die Expression Stress-assoziiierter Gene in der Linie der DUC-Kontrollmäuse wesentlich beeinflusst ($|\log_2FC|<0,5$; *Tab. 18*). Eine Ausnahme diesbezüglich stellten *Hif3a* ($\log_2FC=0,6$; $p=0,025$) und *Ankrd1* ($\log_2FC=2,3$; $p<0,001$) dar (*Tab. 18*).

a) DUC_TM vs sed



b) DUhTP_TM vs sed



Ergebnisse

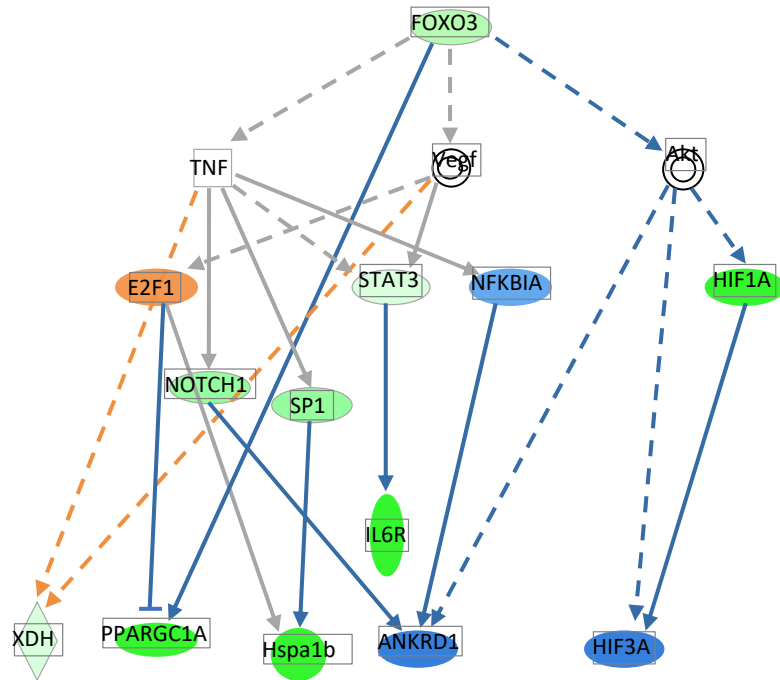
Abb. 25: Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators FoxO3 und seiner Verbindungen zu den (trainingsassoziierten) DEGs im Datensatz modifiziert nach IPKB (Qiagen, IPA; <https://digitalinsights.qiagen.com>) a) Vergleich von DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Belastung (IPA-Abbildung). In beiden Linien war die Expression der FoxO3-abhängigen Signalmoleküle in den jeweils trainierten Individuen gegenüber den untrainierten Mäusen in der Mehrzahl erhöht. Das Ausmaß der Expressionserhöhung (symbolisiert durch die Farbintensität) war im Vergleich der trainierten DUhTP-Individuen gegenüber den untrainierten DUhTP-Mäusen ausgeprägter als im Vergleich der DUC-Kontrollmäuse. *ANKRD1*: Ankyrin Repeat Domain 1; *E2F1*: E2F Transcription Factor 1; *FOXO3*: Forkhead Box O3; *HIF*: Hypoxia Inducible Factor; *Hspa1b*: Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1B; *IL6R*: Interleukin 6 Rezeptor; *NFKB*: Nuclear Factor Kappa B; *NOTCH1*: Notch Receptor 1; *PPARGC1A*: Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha; *SP1*: Sp1 Transcription Factor; *STAT3*: Signal Transducer And Activator Of Transcription 3; *TNF*: Tumor Necrosis Factor; *Vegf*: Vascular Endothelial Growth Factor; *XDH*: Xanthin-Dehydrogenase; \diamond : Enzym; \square : Zytokin. Zur Erklärung der verbleibenden Farben und Symbole vgl. Abb. 14 (S. 55). Die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung liegt vor (Kap. 9.4). Es gilt die CC-BY-Lizenz 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>).

Ausgehend von den Signalwegsanalysen mit IPA (*Abb. 12, 13; S. 52-53*) wurde sich gezielt die Expression von MAPK- und NF- κ B-Genen angesehen. Im NGS-Datensatz ergab sich kein Hinweis darauf, dass Laufbandtraining die Expression dieser Gene wesentlich beeinflusst ($|\log_2FC| < 0,5$; *Tab. 18; S. 76*). Die Proteinanalysen ergaben jedoch für die trainierten Mäuse signifikant höhere Level von p38 MAPK bei den DUhTP-Marathonmäusen bzw. Phospho-p38 MAPK/p38 MAPK bei den DUC-Kontrollmäusen (*Abb. 27; S. 74*).

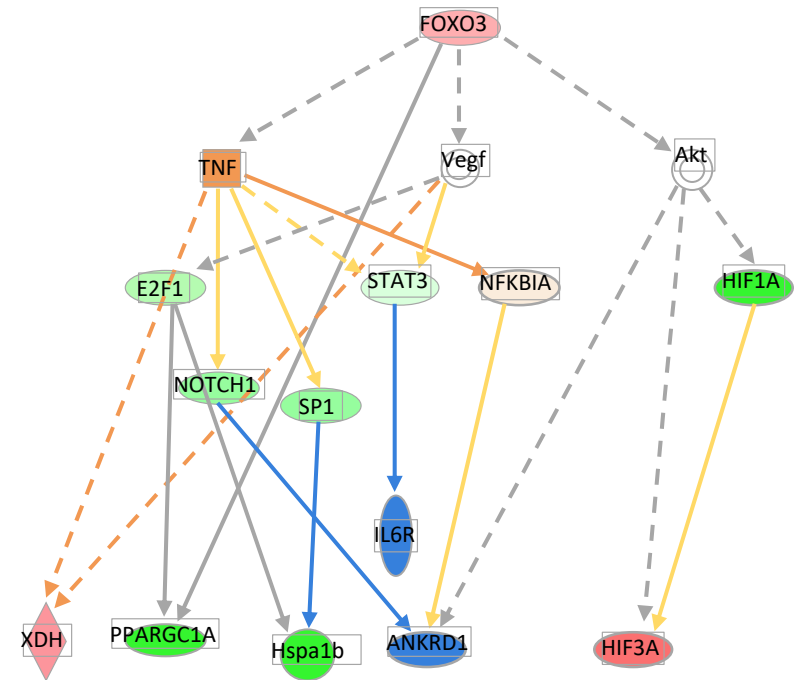
4.7.2 Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien

Die vergleichende Untersuchung von FoxO3-koregulierten Signalkaskaden zeigte deutliche Unterschiede zwischen den betrachteten Mäusen beider Linien sowohl mit (DUhTP_TM vs DUC_TM) als auch ohne Training (DUhTP_sed vs DUC_sed) (*Abb. 26, S. 73*). Im Vergleich der Mäuse beider Linien ohne Training (*Abb. 26a*) war eine signifikant verminderte Expression von FoxO3-mRNA sowie nachgeschalteter Gene (Stat3, Sp1, Notch1, Akt, Hif1a, Il6r, Ppargc1a und Hspa1b) im Muskel der betrachteten DUhTP-Marathonmäuse zu beobachten.

a) DUhTP vs DUC_sed



b) DUhTP vs DUC_TM



Ergebnisse

Abb. 26: Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators FoxO3 und seiner Verbindungen zu den im Linienvergleich differentiell exprimierten Genen im Datensatz nach IPKB (Qiagen, IPA; <https://digitalinsights.qiagen.com>) a) ohne Laufbandtraining und b) mit Laufbandtraining (IPA-Abbildung). Die Mehrheit der dargestellten FoxO3-abhängigen Signalmoleküle war sowohl ohne als auch mit Training in den DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen tendenziell vermindert exprimiert. Zur Erklärung der verwendeten Farben und Symbole vgl. Abb. 25 (S. 71). Die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung liegt vor (Kap. 9.4). Es gilt die CC-BY-Lizenz 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>).

Die endogene Produktion freier Radikale erfolgt zum einen über eine vermehrte oxidative Stoffwechselaktivität in den Mitochondrien und zum anderen über verschiedene Enzymsysteme (Kap. 1.5). Aus diesem Grund wurde sich wegen der im Muskel der betrachteten DUhTP-Marathonmäuse beobachteten erhöhten mitochondrialen Aktivität (Abb. 24; S. 68) gezielt die Expression enzymatischer ROS-Produzenten angesehen (Tab. 18, S. 76). Im Vergleich zu untrainierten DUC-Kontrollmäusen zeigten untrainierte DUhTP-Marathonmäuse signifikant niedrigere Level von PLA2 (*Pla2g4a*: $\log_2FC = -0,7$; $p = 0,012$; *Pla2g4b*: $\log_2FC = -0,6$; $p = 0,035$) und NOX (*Nox4*: $\log_2FC = -1,1$; $p < 0,001$) (Tab. 18).

Es konnten im Muskel der Mäuse alle drei Isoformen der SOD detektiert werden (Tab. 18). Im Vergleich der Mäuse beider Mauslinien (DUhTP-Marathonmaus und DUC-Kontrollmaus) war nur die Expression der zytosolischen SOD1 in der Gruppe der DUhTP-Marathonmäuse unabhängig von einem Training erhöht. Zusätzlich zeigten sich in der Gruppe der DUhTP-Marathonmäuse gegenüber der der DUC-Kontrollmäuse signifikant höhere Level von Genen für die Glutathion-Reduktase (Gsr, mit Training) sowie die GPX (Gpx1, 3, 4, 7; mit und ohne Training) (Tab. 18).

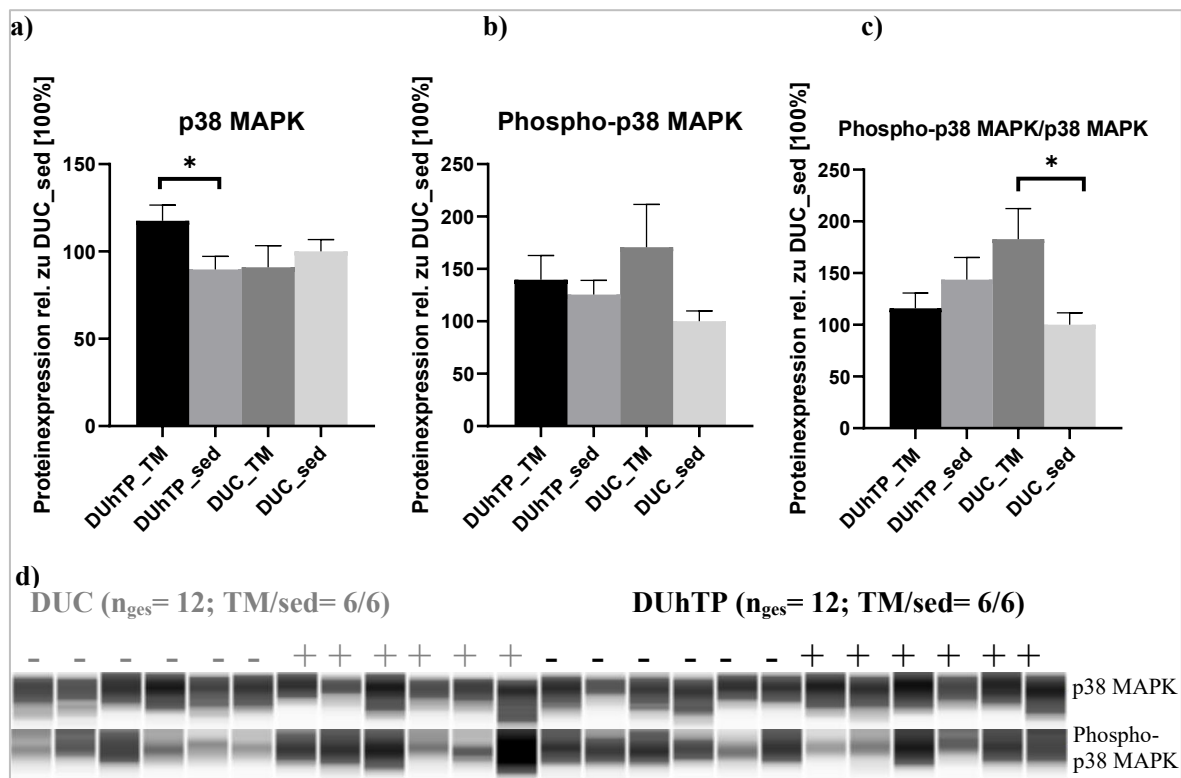


Abb. 27: Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von p38 mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK). Es wurde die Proteinexpression im M. rectus femoris von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training gemessen. Die Daten wurden mittels Kapillarelektrophorese (Wes) gewonnen (d) und im Verhältnis zu DUC_sed (100 %) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (* $p < 0,05$, Student's t-Test). _sed: ohne Laufbandtraining (-); _TM: mit Laufbandtraining (+)

Ergebnisse

Hspala und *Hspalb* gehörten zu den besonders deutlich differentiell exprimierten Genen in der betrachteten Gruppe der DUhTP-Marathonmauslinie nach drei Wochen Training (Tab. 13; S. 49). Interessanterweise wiesen die untrainierten DUhTP-Marathonmäuse ein signifikant verringertes Expressionslevel von *Hspala* ($\log_2FC = -2,4$; $p < 0,001$) und *Hspalb* ($\log_2FC = -3,6$; $p < 0,001$) im Vergleich zu untrainierten DUC-Kontrollmäusen auf (Tab. 18; S. 76).

Bezüglich der Expression von MAPK- und NF- κ B-Genen zeigten DUhTP-Marathonmäuse im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen signifikant höhere Genexpressionslevel von p38 MAPK und ERK1 sowie signifikant niedrigere Level von JNK und relativ ähnliche Level von NF- κ B (Tab. 18). Der in den NGS-Daten gesehene Expressionsunterschied konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden (Abb. 27; S. 74). Die NF- κ B-Proteinlevel waren zwischen den Vergleichen ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 28).

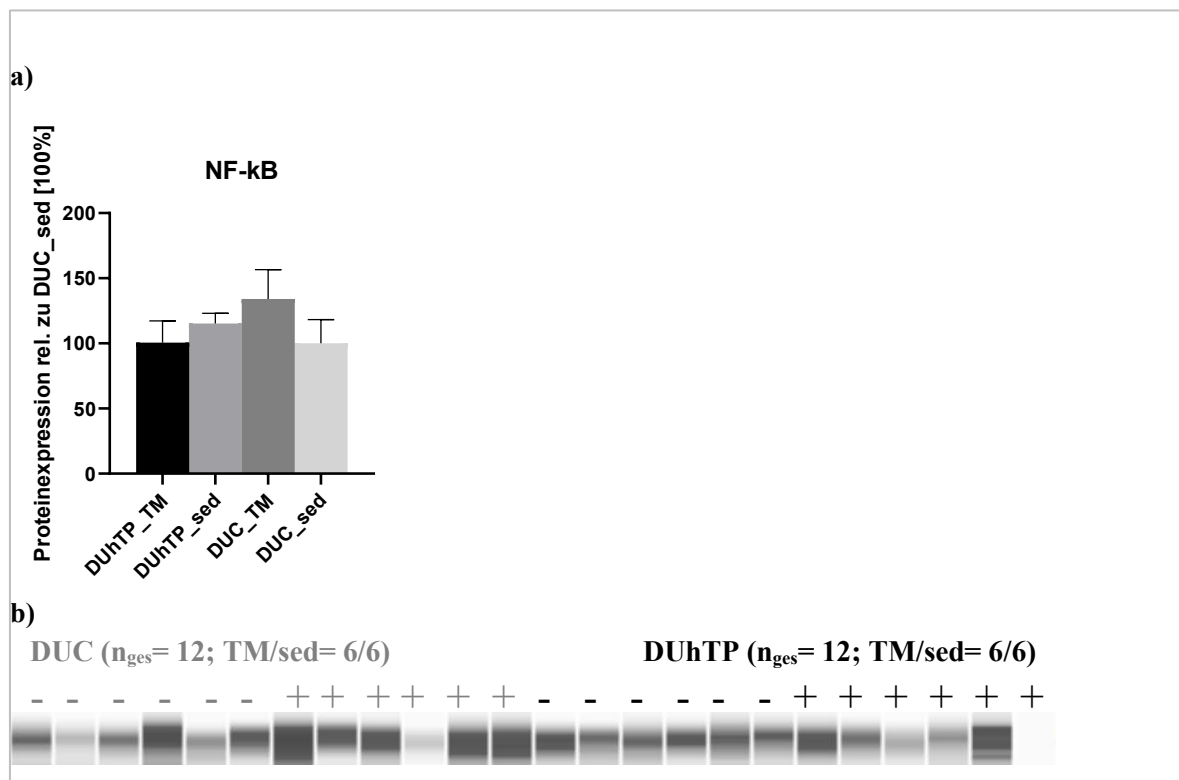


Abb. 28: Die Expression von NF- κ B im Muskel von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training. Die Daten wurden mittels Kapillarelektrophorese (Wes) gewonnen (b) und im Verhältnis zu DUC_sed (100 %) abgebildet (a). Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM). _sed: ohne Laufbandtraining (-); _TM: mit Laufbandtraining (+)

Tab. 18: Vergleich der Expression von Stress-induzierten Molekülen und Komponenten der Abwehr oxidativen Stresses

Funktion ¹		DUhTPvsDUC_sed		DUhTPvsDUC_TM		DUhTP_TM vs sed		DUC_TM vs sed	
		log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	p-Wert
ROS-Produzenten	Nox4	-1,1	<0,001	-1,2	<0,001	0,2	0,440	0,3	0,296
	Pla2g4a	-0,7	0,012	-0,3	0,263	0,7	0,006	0,3	0,198
	Pla2g4b	-0,6	0,035	-0,3	0,260	0,1	0,720	-0,2	0,535
	Xdh	-0,2	0,346	0,6	0,004	0,8	<0,001	0,0	0,991
Antioxidative Mechanismen/ Schutz vor Zellschädigung	Gpx1	0,6	<0,001	0,5	<0,001	0,2	0,439	0,3	0,412
	Gpx3	0,9	<0,001	0,8	<0,001	-0,2	0,498	-0,1	0,936
	Gpx4	0,5	<0,001	0,5	<0,001	0,1	0,762	0,1	0,748
	Gpx7	0,3	0,046	0,3	0,023	0,2	0,247	0,2	0,629
	Gsr	0,1	0,529	0,3	0,012	0,1	0,749	-0,1	0,696
	Hspa1a	-2,4	<0,001	-0,7	0,317	2,3	0,003	0,6	0,803
	Hspa1b	-3,6	<0,001	-1,8	0,025	2,3	0,017	0,5	0,889
	Nfe2l2	-0,4	0,001	-0,0	0,872	0,5	0,002	0,1	0,914
	Sod1	0,4	<0,001	0,4	<0,001	0,0	0,980	-0,0	0,992
	Sod2	-0,1	0,213	0,1	0,479	0,0	0,611	-0,1	0,148
	Sod3	0,1	0,590	0,5	0,015	0,2	0,452	-0,1	0,879
	MAP-Kinase Signalweg	Jun	-0,6	0,014	-0,2	0,305	0,5	0,033	0,2
Mapk1		-0,1	0,344	-0,1	0,221	-0,0	0,963	0,0	0,986
Mapk3		0,3	0,007	0,5	<0,001	0,1	0,473	0,0	0,936
Mapk8		-0,2	0,004	-0,4	<0,001	-0,2	0,003	-0,1	0,410
Mapk9		-0,3	0,012	-0,3	0,009	-0,1	0,532	-0,1	0,612
Mapk11		0,2	0,453	0,6	0,002	0,4	0,072	0,0	0,987
Mapk12		0,5	<0,001	0,7	<0,001	0,3	0,013	0,1	0,807
Mapk14		0,1	0,523	0,1	0,231	0,1	0,749	0,0	0,995
Nfkb1		-0,2	0,070	-0,1	0,203	0,0	0,645	0,0	0,937
Nfkb2		0,0	0,861	0,0	0,874	0,2	0,113	0,3	0,057
Rel		-0,9	<0,001	-1,1	<0,001	-0,2	0,525	-0,1	0,956
Rela		0,2	0,038	0,4	0,001	0,2	0,158	0,1	0,824
Relb		0,2	0,249	-0,1	0,636	0,0	0,964	0,2	0,115
Weitere Transkriptionsfaktoren		Ankrd1	0,0	0,992	-0,9	0,047	1,4	0,002	2,3
	Foxo3	-0,4	0,002	0,2	0,093	0,6	<0,001	0,0	0,987
	Hif1a	-0,8	<0,001	-0,8	<0,001	-0,1	0,784	-0,1	0,921
	Hif3a	0,4	0,199	0,8	0,003	1,1	<0,001	0,6	0,025

Ergebnisse

log₂ Fold Change und p-Werte in fett, falls p<0,05; ¹ unter <https://www.uniprot.org>

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen eines Ausdauertrainings einerseits sowie einer Ausdauerselektion andererseits auf das Skelettmuskeltranskriptom. Hierfür wurden Transkriptomdaten des *M. rectus femoris* von auf Ausdauer selektierten Mäusen (DUhTP-Marathonmäuse) sowie von nicht-selektierten Kontrollen (DUC-Kontrollmäuse) analysiert und miteinander verglichen. Die genetisch fixierte hohe Ausdauerkapazität der DUhTP-Marathonmäuse ist nicht Resultat eines Trainings und das freiwillige Aktivitätslevel der DUhTP-Marathonmäuse unterscheidet sich nicht von dem der unselektierten DUC-Kontrollmäuse (Brenmoehl et al. 2013). Die Etablierung des Mausmodells erfolgte inzucht- und genmanipulationsfrei über 140 Mausgenerationen hinweg und stellt damit das aktuell am langfristigsten angelegte Modell einer natürlichen Ausdauerselektion dar (Swallow et al. 1998; Thompson et al. 2017). Für die Beurteilung der Transkriptomveränderungen in Folge des Ausdauertrainings wurden ausdauerselektierte DUhTP-Marathonmäuse und nicht-selektierte DUC-Kontrollmäuse für 3 Wochen auf einem Laufband trainiert. Die Untersuchung von trainingsbedingten Transkriptomveränderungen in bereits auf Ausdauer selektierten Organismen stellt einen bis dato noch nicht publizierten neuen Studienansatz dar.

Sowohl an menschlichen Probanden als auch am Tiermodell wurden die Auswirkungen körperlicher Aktivität auf den Organismus bereits mehrfach untersucht: Ein Bewegungsmangel gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren für degenerative Vaskulopathien wie die Koronare Herzkrankheit oder den Schlaganfall und damit für die deutschland- und weltweit häufigste Todesursache (Weltgesundheitsorganisation WHO, Stand 2020). Bewegung hat aber nicht nur Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System, sondern auf den gesamten menschlichen Organismus: So haben vielseitige, insbesondere kraftbetonte Belastungen knochenanabole Effekte und minimieren dadurch das Risiko, an Osteoporose zu erkranken (MacKnight 2017; Wilson 2019). Trainingsbedingt gestärkte Muskeln, Sehnen und Bänder schützen außerdem den Knochen und verringern so das Frakturrisiko. Darüber hinaus werden der altersbedingte Muskelabbau vermindert und koordinativen Fähigkeiten verbessert (Dunsky 2019; Yoo et al. 2018). Neben einer vermehrten Durchblutung der aktiven Muskulatur kommt es auch zu einer vermehrten Durchblutung des Gehirns. Durch die bessere Sauerstoffversorgung erhöht sich die geistige Leistungsfähigkeit und Konzentrations- und Denkvorgänge fallen leichter und werden beschleunigt (Northey et al. 2018). Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl die Lebenserwartung als auch der Alterungsprozess selbst durch körperliche Aktivität in positiver Weise beeinflusst werden (Brandts und van den Brandt 2019; Werner et al. 2019). Bekannt ist darüber hinaus, dass körperliche Aktivität die Symptome einer Depression mindern und dieser sogar vorbeugen kann (Belvederi Murri et al. 2018; Harvey et al. 2018). Hinsichtlich der Prävention von Neoplasien wird der körperlichen Aktivität eine

zunehmend größere Bedeutung beigemessen. So soll durch regelmäßige moderate Aktivität u.a. das Risiko, an Kolorektal-, Bronchial-, Mamma- und Prostatakarzinom zu erkranken, deutlich minimiert werden (Campos et al. 2018; Emaus und Thune 2011; Graf und Wessely 2010; Oruc und Kaplan 2019). Es wird sogar vermutet, dass moderates Ausdauertraining die Ansprechbarkeit eines Tumors auf Chemotherapie verbessert und somit den Therapieerfolg erhöht (Florez Bedoya et al. 2019; Schadler et al. 2016).

Bis dato veröffentlichte Publikationen hinsichtlich der auf Transkriptomebene fixierten Eigenschaften eines ausdauernden Skelettmuskels beschränken sich überwiegend auf das Tiermodell (Flück 2013; Yaghoob Nezhad et al. 2019). Eine genomweite Transkriptomanalyse des Skelettmuskels mit und ohne Trainingseinfluss sowie im Vergleich von auf Ausdauer- und nicht auf Ausdauer selektierten Mäusen ist bislang noch nicht publiziert worden.

5.1 Daten von phänotypischen Veränderungen der Skelettmuskulatur

Im Falle der hier vorliegenden Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Oberschenkelmasse (*M. rectus femoris*) im Vergleich der betrachteten Individuen einer Linie mit und ohne Laufbandtraining. Diese Beobachtung entsprach der Erwartung, da auch bei menschlichen Probanden und bei Ratten gezeigt werden konnte, dass Ausdauertraining keinen Muskelzuwachs hervorruft (Lai et al. 2018; Tsai et al. 2013; Vargas et al. 2019).

Interessant war, dass in der vorliegenden Studie die DUhTP-Marathonmäuse sowohl mit als auch ohne Training eine signifikant geringere Masse des Oberschenkels und auch eine signifikant geringere Körpermasse als die DUC-Kontrollmäuse aufwiesen. Die bessere Ausdauer der DUhTP-Marathonmäuse im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen war also nicht durch eine erhöhte muskuläre Masse bedingt und steht damit im Gegensatz zu den Befunden von Mujika et al., die an Radsportlern einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Muskelmasse und einer verbesserten Ausdauer vermuteten (Mujika et al. 2016). Es kann vermutet werden, dass bei Mäusen nicht die *Muskelmasse*, sondern intrazelluläre Mechanismen mitverantwortlich für eine verbesserte Ausdauer sind. Wie genau es sich diesbezüglich jedoch bei Menschen verhält, gilt es noch näher zu untersuchen.

5.2 Transkriptionelle Veränderungen im Oberschenkelmuskel (*M. rectus femoris*)

Die vorliegende Untersuchung zeigte, dass trainingsbedingt (im Vergleich von trainierten mit untrainierten Mäusen) weniger Veränderungen auf Transkriptebene als selektionsbedingt (im Vergleich von DUhTP-Marathonmäusen mit DUC-Kontrollmäusen) erfolgten. Zusätzlich zeigten sich im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen in den DUhTP-Marathonmäusen überwiegend herunterregulierte Gene. Diesbezüglich existieren bis dato keine vergleichbaren Studien. Womöglich wurde durch die Selektion der Marathonmäuse auf verbesserte Ausdauerleistung die

Expression von für die Ausdauer förderlichen Genen stimuliert und andere Gene, die nicht für eine verbesserte Ausdauer notwendig sind, herunterreguliert.

Bei Betrachtung der DEGs der Vergleiche DUhTP_TM vs sed und DUC_TM vs sed in einem Venn-Diagramm (*Abb. 11, S. 46*) zeigten sich 29 DEGs, die den beiden Trainingsgruppen gemeinsam waren. Die Mehrheit der DEGs hingegen erfüllte die Filterkriterien nur in einem der beiden Vergleiche ($n= 173$ für DUhTP_TM vs sed, $n= 159$ für DUC_TM vs sed). Daraus kann abgeleitet werden, dass trainingsbedingte Veränderungen der Genexpression in den betrachteten Mauslinien, DUhTP-Marathonmaus und DUC-Kontrollmaus, auf unterschiedliche Weise erfolgten. Möglich ist jedoch auch, dass aufgrund der geringen Fallzahl oder aufgrund von Messungenauigkeiten scheinbare DEGs detektiert wurden, deren Signifikanz sich aus Zufallsdaten oder Hintergrundrauschen ergab. Eine Erhöhung der Fallzahl könnte hier Abhilfe schaffen.

Im Gegensatz dazu ergab der Kreuzvergleich DUhTP_sed vs DUC_sed und DUhTP_TM vs DUC_TM deutliche Überschneidungen ($n=463$). Dies spricht dafür, dass es sich bei den in den DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen differentiell exprimierten Genen um DUhTP-Marathonmaus-spezifische Expressionsveränderungen handelt, die sowohl mit als auch ohne Laufbandtraining bestehen.

Die im Vergleich der beiden Gruppen DUC_sed und DUhTP_sed am deutlichsten vermehrt exprimierten Moleküle waren das *ribosomal protein S2*, *pseudogene 10* und *das ribosomal protein S26*, *pseudogene 1*. Bei diesen handelt es sich um Transkripte von nicht proteinkodierenden Pseudogenen. Xiao-Jie et al. konnten zwar zeigen, dass Pseudogene nicht, wie lange vermutet, per se funktionslos sind, ihre genaue Funktion gilt es jedoch noch zu untersuchen (Xiao-Jie et al. 2015).

Generell zeigte sich, dass im Vergleich der trainierten mit den untrainierten DUhTP-Marathonmäusen andere DEGs imponierten als im Vergleich der trainierten mit den untrainierten DUC-Kontrollmäusen. Bei der Betrachtung der Anzahl aller unterschiedlich exprimierten Gene konnten innerhalb des Vergleiches von trainierten mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen die wenigsten DEGs festgestellt werden: Das definierte Laufbandtraining bewirkte in der Linie der DUC-Kontrollmäuse eine vermehrte Expression der Genprodukte Mymk, Myh3 und Chrng. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression dieser Moleküle auf eine stimulierte Myoblastenfusion im Zuge der Muskelregeneration hinweist (Chen et al. 2020; Ganassi et al. 2018; Kalamida et al. 2007). Das spricht dafür, dass Laufbandtraining in den DUC-Kontrollmäusen die Muskelregeneration stimuliert. In der DUhTP-Marathonmauslinie hingegen wurden trainingsassoziiert u.a. *RIKEN cDNA B230311B06 gene* und *expressed sequence AI506816* vermehrt exprimiert. Hierbei handelt es sich um nicht proteinkodierende Pseudogene. Außerdem wurden für das Hitzchockprotein HSP70 sowie den Aktivierenden Transkriptionsfaktor 3

kodierende Gene vermehrt exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser Gene bei oxidativem Stress induziert wird und die zelluläre Stressresistenz erhöht (Nyunt et al. 2019; Sable et al. 2018). Es lässt sich vermuten, dass Laufbandtraining in der DUhTP-Marathonmauslinie eine verbesserte Stresstoleranz bewirkt.

5.3 Beteiligung differentiell exprimierter Gene an muskulären Signalwegen

Die in der vorliegenden Untersuchung erfolgten Signalwegsanalysen mit IPA zeigten interessanterweise, dass in allen vier Vergleichen der EIF2 (eukaryotischer Initiationsfaktor 2)-Signalweg unter der Liste der Top 15-Signalwege vertreten war. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg an der Regulierung der mRNA-Translation beteiligt ist (Shrestha et al. 2012). Da Gene dieses Signalweges als DEGs in allen vier Vergleichen auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass er zwar eine Vielzahl von Genen beinhaltet, die unter den identifizierten DEGs vertreten waren, sich aber auch mit anderen Signalwegen überschneidet, in welchen diese DEGs womöglich ebenfalls auftreten. Damit kann die Beobachtung von Blaustein et al. bestätigt werden, die zeigten, dass der EIF2-Signalweg Überschneidungen mit dem Akt-Signalweg aufweist (Blaustein et al. 2013).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl im Vergleich der trainierten DUhTP-Marathonmäuse mit trainierten DUC-Kontrollmäusen als auch im Vergleich der untrainierten Individuen beider Linien miteinander die identifizierten DEGs in 11 der 15 Top-Signalwege übereinstimmten. Auf Grundlage der IPKB (Qiagen) konnten diese Signalwege den drei Unterkategorien Muskeldifferenzierung und Zellwachstum (mit den Signalwegen *Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling*, *Molecular Mechanisms of Cancer*, *Estrogen Receptor Signaling*, *mTOR Signaling* und *NGF Signaling*), Mitochondrien-assoziiierter Metabolismus (mit *Oxidative Phosphorylation*, *Sirtuin Signaling Pathway* und *Estrogen Receptor Signaling*) sowie oxidativer Stress (mit *NRF2-mediated Oxidative Stress Response*, *Huntington's Disease Signaling*, *Mitochondrial Dysfunction* und *Protein Ubiquitination Pathway*) zugeordnet werden. Da diese Signalwege nicht im Vergleich DUhTP_TM vs sed oder im Vergleich DUC_TM vs sed in der Liste der Top 15 Signalwege auftraten, kann vermutet werden, dass es sich um Signalwege handelt, deren DEGs spezifisch durch die Ausdauerselektion verändert exprimiert wurden. Womöglich erfolgten selektionsbedingte Veränderungen der Genexpression in besonderem Maße auf Ebene der Muskeldifferenzierung, des Metabolismus und der Reaktion auf oxidativen Stress. Bedacht werden muss diesbezüglich jedoch, dass die unter den Top 15 Signalwegen aufgeführten Wege womöglich auch in den anderen beiden Vergleichen (DUhTP_TM vs sed; DUC_TM vs sed) auftraten, die DEGs aber mit größerer statistischer Signifikanz mit anderen Signalwegen assoziiert waren.

Nur im Vergleich trainierter DUhTP-Marathonmäuse mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen (DUhTP_TM vs sed) sowie im Vergleich trainierter DUC-Kontrollmäuse mit untrainierten DUC-

Kontrollmäusen (DUC_TM vs sed) unter der Liste der Top 15-Signalwege vertreten waren die *Integrin Linked Kinase (ILK)*-, *Pancreatic Adenocarcinoma*- und *Epithelial Adherens Junction*-Signalwege. Daraus kann geschlossen werden, dass einige der an diesen Signalwegen beteiligten Gene trainingsbedingt verändert exprimiert werden. Ob diese Signalwege eine besondere Rolle bei einem Laufbandtraining erfüllen, gilt es noch zu untersuchen, ist jedoch nicht Thema dieser Arbeit. Insgesamt jedoch waren die Überschneidungen in diesen beiden Vergleichen zahlenmäßig deutlich geringer als in den Vergleichen der Mauslinien miteinander (DUhTPvsDUC_TM; DUhTPvsDUC_sed). Es kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass trainingsbedingte transkriptionelle Veränderungen innerhalb beider Mauslinien (DUhTP und DUC) auf unterschiedliche Weise erfolgen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass, wie *Tab. 10 (S. 45)* zeigte, trainingsbedingt weniger Veränderungen als selektionsbedingt erfolgen.

5.4 Regulation der Muskeldifferenzierung

5.4.1 Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien

Im Zuge des dreiwöchigen Laufbandtrainings zeigten die DUC-Kontrollmäuse eine signifikant erhöhte Expression der Myogenese Regulierenden Faktoren (MRFs) Myogenin (Myog) und Myogener Faktor 3 (Myod1). Da die DUC-Kontrollmäuse primär nicht auf hohe Laufleistung selektiert worden waren, handelt es sich bei der vermehrten Myog- und Myod1-Expression vermutlich um eine physiologische Reaktion auf Ausdauertraining. Eine solche trainingsbedingte Induktion der Myod1- und Myog- Expression konnte durch Quinn und Hydock bei auf dem Laufband trainierten Ratten (Quinn und Hydock 2017) und durch Psilander et al. bei menschlichen Probanden nach singulärem Krafttraining beobachtet werden (Psilander et al. 1985). In der Gruppe der DUhTP-Marathonmäuse konnten keine signifikanten trainingsbedingten Erhöhungen der MRF-Expression beobachtet werden.

Außerdem trainingsbedingt signifikant und deutlich erhöht zeigte sich bei den DUC-Kontrollmäusen das Protein Myomaker (Mymk). Ebenfalls eine, jedoch nicht signifikante, Erhöhung der Mymk-Expression zeigte sich in der Gruppe der DUhTP-Marathonmäuse. Ganassi et al. konnten zeigen, dass die Expression des mit einer vermehrten Myoblastenfusion assoziierten Proteins Mymk durch MRFs stimuliert wird (Ganassi et al. 2018). In mehreren Studien wurde darüber hinaus gezeigt, dass MRFs die Funktion der Satellitenzellen und eine damit einhergehende Muskelregeneration regulieren und insbesondere das MRF Myod1 als Biomarker für aktive Satellitenzellen dient (Hernandez-Hernandez et al. 2017; Koishi et al. 1995): So findet man in ruhenden Zellen eine kaum nachweisbare Myod1-Expression, jedoch nach Muskelaktivität bzw. Muskelschädigung eine vermehrte Myod1-Expression und damit eine erhöhte Satellitenzellaktivität als Ausdruck einer stimulierten Muskelregeneration (Bazgir et al. 2017). Ein gegenüber den

trainierten DUhTP-Marathonmäusen erhöhtes Level an MRFs in der Linie der trainierten DUC-Kontrollmäuse spricht daher am ehesten für einen erhöhten muskulären Regenerationsbedarf der DUC-Kontrollmäuse und eine damit verbundene geringere Ausdauer im Vergleich zu den DUhTP-Marathonmäusen. Demzufolge kann vermutet werden, dass eine verbesserte Ausdauer durch einen verminderten muskulären Regenerationsaufwand erklärt werden kann.

Die vorliegende Studie zeigte zusätzlich eine trainingsbedingt vermehrte Expression von Myl4 im Muskel der DUC-Kontrollmäuse. Dieses Gen ist mit dem Herz- sowie dem Skelettmuskel assoziiert; seine Funktion ist noch ungeklärt (Lindqvist et al. 2016; Schiaffino et al. 2015). Es wird vermutet, dass es an der Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten beteiligt ist. Lindqvist et al. gehen davon aus, dass Myl4 für eine normale muskuläre Kraftentwicklung erforderlich ist (Lindqvist et al. 2016). Die Myl4-Expression in den DUhTP-Marathonmäusen ohne Training war höher als in den untrainierten DUC-Kontrollmäusen, war aber (anders als im Vergleich der trainierten mit den untrainierten DUC-Kontrollmäusen) nicht signifikant niedriger im Vergleich zu den trainierten DUhTP-Marathonmäusen. Man kann vermuten, dass die trainingsbedingte Erhöhung der Myl4-Expression in der Linie der DUC-Kontrollmäuse einen Anpassungsmechanismus an erhöhte muskuläre Anforderungen darstellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten eine trainingsbedingt signifikant vermehrte Expression von Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) im Muskel der DUC-Kontrollmäuse. Dabei handelte es sich um die Untereinheiten $\alpha 1$, β und γ , die als muskelspezifisch beschrieben wurden (Rahman et al. 2020). Da die Linie der DUC-Kontrollmäuse nicht auf hohe Ausdauerleistung selektiert wurde, handelt es sich bei der vermehrten Expression von nAChR vermutlich um eine physiologische Reaktion auf das Ausdauertraining. Eine trainingsbedingt vermehrte Expression von ZNS-spezifischen nAChR konnten bereits Zhou et al. an Ratten zeigen (Zhou et al. 2018). Die Ratten absolvierten ein Laufbandtraining, die Expressionsmessungen erfolgten jedoch im präfrontalen Kortex. Eine trainingsbedingte Erhöhung der Dichte von nAChR konnten Desaulniers et al. am Skelettmuskel von Ratten zeigen (Desaulniers et al. 1998). Bereits Kalamida et al. zeigten 2007, dass eine vermehrte Expression muskulärer nAChR mit einer erhöhten Myoblastenfusion im Zuge der Myogenese und Muskelregeneration verbunden ist (Kalamida et al. 2007). Es lässt sich vermuten, dass auch die vermehrte Expression von nAChR in der vorliegenden Untersuchung für einen trainingsbedingt erhöhten muskulären Regenerationsbedarf der DUC-Kontrollmäuse spricht.

5.4.2 Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien

Der Skelettmuskel ist charakterisiert durch drei Muskelfasertypen (Typ I, IIA, IIB) (Staron et al. 2000), wobei die überwiegende Faserart des Muskels durch die an ihn gestellten Anforderungen bedingt ist (Kap. 1.1.2). Mit ausdauernden Typ I-Fasern assoziierte Moleküle sind *Myosin Heavy*

Chain 6 und *7* (Myh6, Myh7) sowie die skelettmuskelspezifische Methyltransferase *Mettl21c* (Stuart et al. 2016; Wiederstein et al. 2018). Im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen wiesen die untersuchten DUhTP-Marathonmäuse eine ähnliche bzw. tendenziell sogar eine eher verminderte Expression dieser Typ I-Faser-assoziierten Moleküle im *M. rectus femoris* auf. Auch die Expression des *Myocyte Enhancer Factors Mef2c* war im Linienvergleich in den DUhTP-Marathonmäusen vermindert. Bereits zuvor wurde am Mausmuskel gezeigt, dass das durch dieses Gen kodierte Protein mit einer Muskelfaserumwandlung in Richtung Typ I-Fasern beteiligt sein soll (Potthoff et al. 2007). In trainierten DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu trainierten DUC-Kontrollmäusen als signifikant vermehrt exprimiert gefunden wurde das Gentranskript für *Actn3*. Dieses wurde als überwiegend mit einer erhöhten Muskelkraft assoziiertes Typ II-Faser-Molekül beschrieben (Houweling et al. 2017; Mills et al. 2001).

Anders als vermutet sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Studie also tendenziell gegen eine Dominanz ausdauernder Typ I-Fasern im *M. rectus femoris* der DUhTP-Marathonmauslinie. Daraus kann abgeleitet werden, dass Typ I-Fasern nicht maßgeblich mit der besseren Ausdauerleistung der DUhTP-Marathonmäuse im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen assoziiert sind.

Innerhalb der DUC-Kontrollmäuse änderte sich die Expression sowohl Typ I- als auch Typ II-spezifischer Moleküle trainingsbedingt nicht signifikant. Es kann vermutet werden, dass in der vorliegenden Untersuchung durch das Laufbandtraining keine Faserumwandlung im *M. rectus femoris* erfolgte. Jedoch wurde sowohl bei menschlichen Probanden als auch bei Ratten bereits gezeigt, dass Ausdauertraining durchaus die muskuläre Zusammensetzung verändert und einen Anstieg von Typ I-Fasern bewirkt (Howald et al. 1985; Zheng et al. 2020). Bei Zheng et al. erfolgte die Analyse der Faserzusammensetzung auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Messungen und ist somit aussagekräftiger als die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Deswegen müssten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls noch histologische Analysen des Muskelgewebes angeschlossen werden, um den vorliegenden Fasertyp *in vivo* zu ermitteln.

Damit eine Muskelhypertrophie und damit ein Muskelwachstum möglich sind, muss die im Muskel erfolgende Proteinsynthese die gleichzeitig ablaufenden Protein-katabolen Mechanismen übertreffen (Tipton und Wolfe 2001). Diese Muskelhypertrophie kann dabei durch eine Vielzahl anaboler Stimuli induziert werden. Einer dieser Stimuli ist IGF1 und der damit assoziierte IGF1-Akt-Signalweg (Schiaffino und Mammucari 2011).

Die hier erfolgten Untersuchungen zeigten in den Vergleichen „trainierte vs. untrainierte DUhTP-Marathonmaus“ bzw. „trainierte vs. untrainierte DUC-Kontrollmaus“ keine (DUC) bis überwiegend keine (DUhTP) trainingsbedingten Veränderungen von Molekülen des IGF1-Akt-Signalweges auf mRNA-Ebene. Daraus kann vermutet werden, dass ein Laufbandtraining den

IGF1-Akt-Signalweg nur in geringem Maße beeinflusst. Da Dickinson et al. bei menschlichen Probanden eine Beeinflussung des IGF1-AKT-Signalweges durch Krafttraining sahen, kann vermutet werden, dass die Aktivierung dieses Signalweges von der Trainingsart abhängig ist (Dickinson et al. 2018).

Interessant ist, dass die Expressionslevel von mit diesem Signalweg assoziierten Genen in DUhTP-Marathonmäusen verglichen mit den DUC-Kontrollmäusen vorwiegend niedrigere Werte aufwiesen (Abb. 29). Daraus kann vermutet werden, dass dieser Signalweg in DUhTP-Marathonmäusen weniger aktiv als in den DUC-Kontrollmäusen ist. Die kleinere Körpergröße und geringere Muskelmasse der DUhTP-Marathonmäuse verglichen mit DUC-Kontrollmäusen unterstützt die mutmaßlich verringerte IGF1-Aktivierung in der DUhTP-Marathonmauslinie.

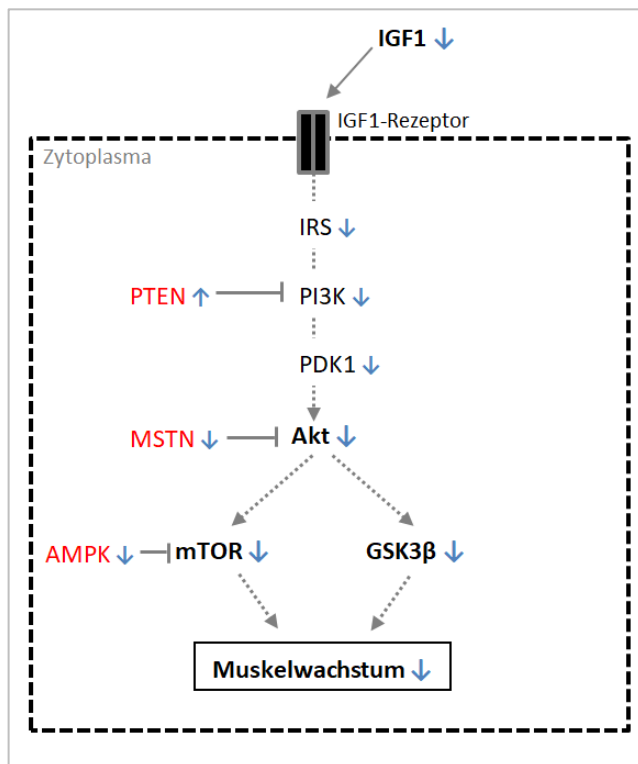


Abb. 29: Schema der am IGF1-Akt-Signalweg beteiligten DEGs und ihre Expression im Vergleich zur Kontrolllinie DUC. Dargestellt sind die IGF1-bedingten Auswirkungen auf das Muskelwachstum in der DUhTP-Marathonmauslinie. Die blauen Pfeile symbolisieren die jeweilige nachgewiesene differentielle Expression im Muskel der DUhTP-Linie im Vergleich zur Kontrolle (↑ Hochregulation in der DUhTP-Linie; ↓ Herunterregulation in der DUhTP-Linie). Rot dargestellt sind ausgewählte Inhibitoren des IGF1-Akt-Signalweges. Eine gestrichelte Linie symbolisiert einen indirekten, eine durchgezogene Linie einen direkten Effekt. Akt: spezifische Akt-Aktivität (Proteinebene); AMPK: Adenosinmonophosphat-Kinase; DUhTP: Dummerstorf high Treadmill Performance; GSK3β: Glykogensynthase-Kinase 3 beta; IGF1: Insulin-like growth factor 1; IRS: Insulin Rezeptor Substrat; MSTN: Myostatin; mTOR: mammalian Target of Rapamycin; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PTEN: Phosphatase and tensin homolog (spezifische Aktivität auf Proteinebene)

IGF1 dient also vermutlich weniger der Verbesserung der Ausdauer, sondern vielmehr der Erhöhung der Muskelmasse und -kraft. Dies konnte durch Ikeda et al. bestätigt werden, die am M. gastrocnemius von Ratten eine Zunahme der Muskelkraft in Verbindung mit einer erhöhten IGF1-Expression sahen (Ikeda et al. 2013).

Die erhöhte Proteinexpression des IGF1-Rezeptors bei den DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen steht im Widerspruch zu den Daten der RNASeq. Die Ursachen könnten im Studiendesign (messtechnische Fehler, geringe Anzahl der untersuchten Tiere) begründet sein. Denkbar wären jedoch auch posttranskriptionelle Modifikationen, die die Transkriptstabilität beeinflussen.

Für Akt als Bestandteil des IGF1-Akt-Signalweges konnten auf mRNA-Ebene keine Unterschiede zwischen beiden Mauslinien DUhTP und DUC festgestellt werden. Anders als erwartet zeigten die Proteinanalysen aber eine gegenüber den DUC-Kontrollmäusen erhöhte Expression des gesamten Akt in den DUhTP-Marathonmäusen. Die Betrachtung der spezifischen Akt-Aktivität (Ratio aus Phospho-Akt zu Akt) zeigte eine erniedrigte Akt-Aktivität und unterstützt damit die zuvor genannte Vermutung einer Herunterregulation des IGF1-Akt-Signalweges bei den DUhTP-Marathonmäusen.

Der in die Achse Akt-mTOR eingebundene Proteinkomplex mTOR besteht aus zwei größeren Untereinheiten, mTORC1 und mTORC2 (Wullschleger et al. 2006), welche wiederum durch verschiedene Gene kodiert werden. So kodiert das Gen *Rptor* für das mTORC1-assoziierte Molekül *regulatory-associated protein of mTOR*. Ein mTORC2-assoziiertes Gen hingegen ist *Rictor*, das für den *rapamycin-insensitive companion of mTOR* kodiert. Da Akt über mTORC2 phosphoryliert und aktiviert wird (Guertin et al. 2006) und *Rictor* in der DUhTP-Marathonmauslinie vermindert exprimiert war, sprach auch diese Tatsache ebenfalls für eine verminderte Akt-Aktivierung in der DUhTP-Marathonmauslinie im Vergleich zur Kontrolllinie DUC. Das Protein Akt seinerseits hemmt den Proteinabbau durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie. Zusätzlich stimuliert es die Proteinsynthese über mTOR und die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) (Manning und Toker 2017). Auch Gsk3 β , mTOR und die Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie waren in der DUhTP-Marathonmauslinie im Vergleich zur Kontrolllinie DUC vermindert exprimiert. Es kann also tatsächlich von einer verminderten Aktivierung des IGF1-Akt-Signalweges und damit auch einer verminderten Stimulation des Muskelwachstums in der DUhTP-Marathonmauslinie ausgegangen werden. Offen bleibt nun die Frage, welche Faktoren in der DUhTP-Marathonmaus das IGF1-vermittelte Muskelwachstum kontrollieren.

Eine lokale Kontrolle des IGF1-Akt-Signalweges erfolgt durch die Familie der IGF-bindenden Proteine (IGFBP). Diese sind in der Lage, im Blutkreislauf und Gewebe zirkulierende IGF-Moleküle mit oft stärkerer Affinität als der IGF-Rezeptor selbst zu binden (Allard und Duan 2018).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine vermehrte Expression von IGFBPs im Muskel und sprachen so für eine IGFBP-vermittelte Kontrolle des IGF1-Akt-Signalweges im Muskel trainierter DUhTP-Marathonmäuse.

Als der Hauptinhibitor des IGF1-Akt-Signalweges gilt jedoch die Phosphatase PTEN (Shan et al. 2019). Auch in dem DUhTP-Marathonmausmodell konnte nachgewiesen werden, dass das IGF1-vermittelte Muskelwachstum unter einer negativen Kontrolle durch PTEN steht. So wurde in der DUhTP-Marathonmaus im Linienvergleich eine relativ erhöhte PTEN-Proteinexpression bei gleichzeitig verminderter spezifischer Akt-Aktivität nachgewiesen (vgl. *Abb. 29; S. 84*).

In einem Myostatin-Knockout Mausmodell wurde darüber hinaus gezeigt, dass auch das Protein Myostatin als Inhibitor des Akt-Signalweges gilt und Muskelwachstum verhindert (Morissette et al. 2009). Zusätzlich wurde auch die AMP-Kinase (AMPK) als ein Inhibitor der IGF1-Akt-Achse beschrieben, da sie über die Inhibierung des nachgeschalteten mTORC1 Muskelwachstum unterbindet (Wang et al. 2018). Gleichzeitig fungiert AMPK auch als Sensor für eine gestörte Energiehomöostase und bedingt eine Aktivierung von mTORC2 (Kazyken et al. 2019). Obwohl also auch AMPK und Myostatin als Inhibitoren der IGF1-Akt-Achse angesehen werden können, scheint ihr Einfluss auf das Muskelwachstum in der DUhTP-Marathonmauslinie wenig relevant zu sein: So zeigte sich im Muskel der DUhTP-Marathonmäuse keine Negativkorrelation zwischen der Akt-Expression einerseits und der AMPK oder Mstn-Expression andererseits. Es lässt sich also schlussfolgern, dass der PTEN-Inhibition im Muskel mehr Bedeutung zukommt als einer AMPK- oder Myostatin-vermittelten Inhibition.

Die DUhTP-Marathonmäuse sind also vermutlich durch eine im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen verminderte Myogenese aufgrund einer verminderten Aktivierung des IGF1-Akt-Signalweges gekennzeichnet (*Abb. 29; S. 84*). Diese Beobachtung wiederum konnte mit der phänotypisch verminderten Muskelmasse der DUhTP-Mäuse im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen in Verbindung gebracht werden.

5.5 Mitochondrialer Metabolismus

5.5.1 Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien

In den untersuchten Mäusen beider Mauslinien war UCP2 trainingsbedingt signifikant vermehrt exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Hauptfunktion von UCP2 als Entkoppler der Atmungskette in einer Verminderung der durch Mitochondrien produzierten ROS besteht (Arsenijevic et al. 2000). Liu et al. konnten darüber hinaus ebenfalls eine trainingsbedingte Stimulation der UCP2-Expression bei Ratten sehen (Liu et al. 2013). Es kann also vermutet werden, dass UCP2 im Zuge eines Laufbandtrainings vermehrt exprimiert wird und einen physiologischen Schutzmechanismus des Muskels vor ROS darstellt.

Im Vergleich von trainierten mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen zeigte sich in den trainierten Individuen ein im Mittel signifikant erhöhtes Level an PGC-1 α im NGS-Datensatz. Interessant war hierbei, dass die erhöhte PGC-1 α -Expression nur im Vergleich trainierter mit untrainierter DUhTP-Marathonmäuse, nicht aber im Vergleich trainierter mit untrainierter DUC-Kontrollmäuse gesehen werden konnte. Die trainingsbedingt stimulierte PGC-1 α -Expression ist also vermutlich charakteristisch für die DUhTP-Marathonmäuse und mit der im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen verbesserten Ausdauer assoziiert. Den Zusammenhang zwischen einer verbesserten Ausdauer und PGC-1 α zeigten bereits Handschin et al., die an PGC-1 α -Knockout-Mäusen eine im Vergleich zu Kontrollmäusen verminderte Ausdauer sahen (Handschin et al. 2007).

Da darüber hinaus bereits zuvor am Mausmodell gezeigt werden konnte, dass PGC-1 α die mitochondriale Biogenese stimuliert (Russell et al. 2004), kann vermutet werden, dass das Training eine Erhöhung der mitochondrialen Masse und so eine quantitative Optimierung des Stoffwechsels in der DUhTP-Marathonmaus bewirkt: Mehr Mitochondrien bedeuten mehr Zellorganellen, aufgrund deren Aktivität ATP produziert werden kann. Dieses ATP kann dann wiederum für den kontrahierenden Muskel genutzt werden und bewirkt eine verbesserte Leistungsfähigkeit gegenüber den DUC-Kontrollmäusen, die eine derartige Stimulation der mitochondrialen Biogenese womöglich nicht aufweisen. Einen tatsächlich gegenüber den DUC-Kontrollmäusen vermehrten Mitochondriengehalt im Muskel der DUhTP-Marathonmäuse gilt es jedoch noch auf histologischer Ebene zu untersuchen. Ob auch bei menschlichen Probanden die mitochondriale Biogenese durch PGC-1 α stimuliert werden kann, ist bis dato noch fraglich (Islam et al. 2018).

Im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen war PGC-1 α in den DUhTP-Marathonmäusen interessanterweise jedoch stets niedriger exprimiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass die DUhTP-Marathonmäuse weniger PGC-1 α produzieren und dieses nur bei Bedarf (also körperlicher Belastung) dynamisch hochregulieren, um ihre Ausdauererffizienz zu steigern.

5.5.2 Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien

Der NGS-Datensatz zeigte gegenüber den DUC-Kontrollmäusen in den DUhTP-Marathonmäusen eine überwiegend erhöhte Expression von Molekülen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels sowie der einzelnen Komplexe der Atmungskette. Es kann vermutet werden, dass in DUhTP-Marathonmäusen eine verglichen mit DUC-Kontrollmäusen optimierte Stoffwechsellage vorherrscht. Der Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel sowie die ATP-Produktion im Zuge der Atmungskette sind schon nach wenigen Sekunden Belastungsdauer unerlässlich für die Muskelkontraktion (Raschka und Ruf 2018). Die im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen vermutete Hochregulation des muskulären Energiestoffwechsels in DUhTP-Marathonmäusen ist also wahrscheinlich mit einer verbesserten Ausdauer assoziiert.

Diskussion

Mit dem vermuteten verbesserten Energiestoffwechsel in DUhTP-Marathonmäusen gegenüber DUC-Kontrollmäusen ging auch eine vermehrte Expression muskulärer GLUT4 einher, die jedoch auf Proteinebene nicht bestätigt werden konnte. GLUT4 ist an der insulinabhängigen Glukoseaufnahme beteiligt (Bryant und Gould 2020). Eine Ursache für die widersprüchliche Ergebnisse von RNA- und Proteinanalysen könnte im Studiendesign (geringe Mausanzahl, systematische und zufällige Fehler in der Versuchsdurchführung) liegen, möglich ist jedoch auch, dass ein vermehrter Abbau an GLUT4-Protein im Muskel von DUhTP-Marathonmäusen besteht, der dessen Überexpression verhindert. Dabei kann es sich um einen natürlichen Schutzmechanismus handeln, der gewährleistet, dass auch andere, obligat auf Glukose angewiesene Gewebe wie das ZNS (Horn 2019) ausreichend versorgt werden.

Zusätzlich wiesen trainierte DUhTP-Marathonmäuse gegenüber DUC-Kontrollmäusen eine verminderte LDH-Aktivität auf, während die Aktivität der IDH in DUhTP-Marathonmäusen verglichen mit DUC-Kontrollmäusen sowohl mit als auch ohne Training erhöht war. Unter anaeroben Bedingungen wird über die LDH im Zuge der anaeroben Glykolyse reversibel Laktat gebildet, wobei NADH/H⁺ verbraucht wird. Über die IDH als Enzym des Citratzyklus hingegen wird NADH/H⁺ gebildet (Horn 2019). Eine gegenüber den DUC-Kontrollmäusen verminderte Aktivität der LDH bei gleichzeitig vermehrter IDH-Aktivität in DUhTP-Marathonmäusen lässt vermuten, dass im Muskel der DUhTP-Marathonmäuse die Bildung des Reduktionsäquivalentes NADH/H⁺ stimuliert ist. Diese Vermutung bestätigt die im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen vermutete Stimulation der oxidativen Phosphorylierung in DUhTP-Marathonmäusen, da diese auf ein ausreichendes Vorkommen von reduzierten Reduktionsäquivalenten wie NADH/H⁺ angewiesen ist (Horn 2019).

Verglichen mit DUC-Kontrollmäusen wiesen die DUhTP-Marathonmäuse sowohl mit als auch ohne Training signifikant niedrigere Level des Leptinrezeptors auf. Dieser bindet das hauptsächlich von Fettzellen gebildete Hormon Leptin und stimuliert im Hypothalamus die Ausschüttung von appetitzügelnden Peptiden (Yeung und Tadi 2020). Auch im Muskelgewebe werden Leptinrezeptoren exprimiert, ihre genaue Funktion ist jedoch ungeklärt. Sommer et al. vermuten diesbezüglich einen Zusammenhang zwischen Leptinrezeptoren und Insulinsensitivität (Sommer et al. 2017).

Interessanterweise wiesen die untrainierten DUhTP-Marathonmäuse im Vergleich mit den untrainierten DUC-Kontrollmäusen eine verminderte Expression von PGC-1 α auf, während das Laufbandtraining isoliert innerhalb der DUhTP-Marathonmauslinie die PGC-1 α -Expression stimulierte (*Kap. 4.6.1*). Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass in den Muskeln untrainierter DUhTP-Marathonmäuse weniger Mitochondrien als in denen untrainierter DUC-Kontrollmäuse vorliegen und dementsprechend nicht die Anzahl der Mitochondrien

hauptverantwortlich für eine verbesserte Ausdauer ist. Erst durch einen zusätzlichen Trainingsstimulus (in diesem Fall das dreiwöchige Laufbandtraining) erfolgt möglicherweise über die Hochregulation von PGC-1 α ein Zugewinn an Mitochondrien im Muskel der DUhTP-Marathonmaus. Der vermutlich im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen metabolisch effizienter arbeitende Muskel der DUhTP-Marathonmäuse wird so um weitere zelluläre Kompartimente ergänzt, die dann ebenfalls zur ATP-Gewinnung genutzt werden können. In diesem Zusammenhang wären Analysen des muskulären Mitochondriengehaltes sowie Aktivitätsmessungen weiterer mitochondrialer Enzyme (beispielsweise Enzyme der β -Oxidation oder des Ketonstoffwechsels als alternative Energiequelle) in DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen angebracht. Erst dann kann auf Proteinebene bestätigt werden, was auf Basis der Transkriptomdaten postuliert werden konnte.

5.6 Oxidativer Stress und Muskelarbeit

5.6.1 Trainingsbedingte Veränderungen im Muskel beider Mauslinien

Verglichen mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen wiesen trainierte DUhTP-Marathonmäuse im Mittel signifikant höhere Level des Transkriptionsfaktors FoxO3 auf. Im Vergleich von trainierten DUC-Kontrollmäusen mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen konnte dieser Effekt nicht gesehen werden. Sowohl am Muskel menschlicher Probanden (Brinkmann et al. 2017; Wessner et al. 2019) als auch in isolierten Endothelzellen am Mausmodell (Slopak et al. 2014) konnte bereits gezeigt werden, dass die FoxO3-Expression im Zuge eines Trainings stimuliert wird. Ein Ausbleiben der trainingsbedingten FoxO3-Expressionserhöhung in den DUC-Kontrollmäusen lässt dementsprechend vermuten, dass die FoxO3-Expression in trainierten DUC-Kontrollmäusen inhibiert wird. Einen möglichen Hemmmechanismus auf FoxOs stellt dabei der IGF1-Akt-Signalweg dar (Schiaffino und Mammucari 2011).

Es konnte darüber hinaus beschrieben werden, dass FoxOs die zelluläre Widerstandskraft gegenüber oxidativem Stress erhöhen und der Zellalterung vorbeugen (Sedding 2008; Stefanetti et al. 2018). Eine in trainierten DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu untrainierten DUhTP-Marathonmäusen vermehrte FoxO3-Expression lässt folglich vermuten, dass FoxO3 die trainierten DUhTP-Marathonmäuse vor oxidativem Stress schützt.

Zusätzlich zeigte sich im Vergleich trainierter DUhTP-Marathonmäuse zu untrainierten DUhTP-Marathonmäusen eine deutliche und signifikant vermehrte Expression von für HSP70 kodierenden Genen. Im Vergleich trainierter DUC-Kontrollmäuse zu untrainierten DUC-Kontrollmäusen waren solche signifikanten Unterschiede interessanterweise nicht zu finden. Auch dort zeigte HSP70 jedoch eine tendenziell vermehrte Expression in trainierten DUC-Kontrollmäusen. Bereits zuvor konnte eine solche trainingsbedingte Stimulation von HSP70 sowohl am Muskel menschlicher

Probanden als auch am Muskel von Ratten gezeigt werden (Cuthbert et al. 2019; Gokce et al. 2019). Die vorliegende Arbeit bestätigt damit die Ergebnisse vorangegangener Studien und zeigt somit ebenfalls, dass die Expression von HSP70 durch ein Laufbandtraining simuliert wird. HSP70 ist erforderlich für die korrekte Faltung und Aktivierung von Proteinen im Zytosol und somit für die Aufrechterhaltung der physiologischen Muskelfunktion in Situationen erhöhter muskulärer Beanspruchung (Liu und Steinacker 2002; Liskutin et al. 2020). Es kann folglich vermutet werden, dass in den trainierten Individuen der DUhTP-Marathonmaus- und denen der DUC-Kontrolllinie eine Stimulation von HSP70 die physiologische Zellfunktion unter Belastung aufrechterhält.

Zusätzlich konnten sowohl im Vergleich trainierter mit untrainierter DUhTP-Marathonmäuse als auch im Vergleich trainierter mit untrainierter DUC-Kontrollmäuse in den jeweils trainierten Individuen deutlich erhöhte Level des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF) sowie der Ankyrin Repeat Domain 1 (ANKRD1) gesehen werden. Die Familie der Transkriptionsfaktoren HIF sowie der Ankyrin Repeat-Proteine spielt eine entscheidende Rolle bei der transkriptionellen Stressantwort und ihre Expression wird im Zuge körperlicher Aktivität stimuliert (Cenni et al. 2019; Ježek et al. 2020; Ling et al. 2017; Lundby et al. 2006). Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die vermehrte ANKRD1- und HIF-Expression in den trainierten Mäusen beider Mauslinien (DUhTP und DUC) eine physiologische Reaktion auf muskuläre Belastung darstellt und dazu dient, die Zellhomöostase auch unter körperlicher Anstrengung aufrechtzuerhalten. In diesem Zusammenhang müssen weitere Analysen angeschlossen werden, um die ANKRD1- und HIF-abhängigen Effekte im Muskel noch genauer zu untersuchen

Auf RNA-Ebene ergab sich kein Hinweis darauf, dass die Expression von MAPK und NF- κ B-Genen durch das Laufbandtraining wesentlich beeinflusst wurde. Bei Betrachtung der Proteinanalysen zeigten sich für die trainierten Mäuse jedoch signifikant höhere Level von p38 MAPK (DUhTP) bzw. der Ratio aus Phospho-p38 MAPK und p38 MAPK (DUC). Diese Diskrepanz könnte das Ergebnis von Messungenauigkeiten in den NGS- oder einer hohen Variabilität der Messwerte der Proteinanalysen sein, die das Ergebnis aufgrund der geringen Individuenanzahl verfälschten. Da jedoch bereits Ludlow et al. eine trainingsbedingt erhöhte Ratio Phospho-p38 MAPK/p38 MAPK bei Mäusen nach einem singulären Lauf auf dem Laufband sahen (Ludlow et al. 2017), kann auch vermutet werden, dass Laufbandtraining durchaus eine vermehrte Aktivierung von p38 MAPK bewirkt, diese Aktivierung in Form einer Phosphorylierung jedoch erst auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt und nicht über eine vermehrte mRNA-Expression.

5.6.2 Unterschiede im Vergleich beider Mauslinien

Im Vergleich zu untrainierten DUC-Kontrollmäusen wiesen untrainierte DUhTP-Marathonmäuse signifikant niedrigere Level von PLA2 und NOX auf. Sowohl am Tiermodell als auch an menschlichen Probanden konnte gezeigt werden, dass NOX und PLA2 wesentliche Produzenten

von ROS im Muskel sind (Damiano et al. 2019; Henríquez-Olguin et al. 2019; Zhou et al. 2019). Daraus kann vermutet werden, dass im Muskel der DUhTP-Marathonmäuse weniger ROS als im Muskel der DUC-Kontrollmäuse produziert werden. Auch die im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen gezeigte Expression von Genen der mitochondrialen Atmungskette widerspricht dieser Behauptung nicht, da, wie von Cadenas et al. beschrieben, der mitochondrialen ROS-Produktion deutlich weniger Bedeutung zukommt als lange Zeit vermutet (Cadenas 2018). Es kann folglich von einem durchaus verminderten ROS-Niveau in DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen ausgegangen werden. Wie darüber hinaus von Steinbacher et al. beschrieben, resultiert ein Übermaß an ROS in kontraktile Dysfunktion und muskulärer Ermüdung (Steinbacher und Eckl 2015). Darauf fußend kann geschlussfolgert werden, dass eine verminderte enzymatische ROS-Produktion positive Auswirkungen auf die muskuläre Ausdauerleistung hat. Interessanterweise konnten Youm et al. erst kürzlich an Nox4-Knockout-Mäusen zeigen, dass NOXs neben ihrer Rolle als ROS-Produzenten auch mit Myoblastenfusion und Muskelwachstum assoziiert sind (Youm et al. 2019). Auch anhand der Daten der vorliegenden Arbeit konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden, da die DUC-Kontrollmäuse eine im Mittel signifikant höhere Muskelmasse als die DUhTP-Marathonmäuse bei im Vergleich zu DUhTP-Marathonmäusen signifikant erhöhten Nox4-Expressionsniveaus aufwiesen.

Interessanterweise waren die FoxO3-Expressionslevel als Indikator für eine potenziell erhöhte oxidative Stressresistenz in untrainierten DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu untrainierten DUC-Mäusen signifikant niedriger. Im Vergleich von trainierten zu untrainierten DUhTP-Marathonmäusen konnten im Muskel der trainierten Individuen jedoch signifikant höhere Expressionslevel nachgewiesen werden (*Kap. 4.6.1*). Es kann vermutet werden, dass FoxO3 bedarfsabhängig in Folge des Laufbandtrainings exprimiert wird. Somit lag es im Vergleich der untrainierten Individuen beider Mauslinien in DUhTP-Marathonmäusen initial niedriger exprimiert vor, wurde jedoch trainingsbedingt vermehrt exprimiert und ist so im Vergleich der trainierten Individuen in trainierten DUhTP-Marathonmäusen tendenziell sogar höher exprimiert. Es wurden bis dato jedoch keine vergleichbaren Beobachtungen publiziert. Dementsprechend wäre es angebracht, weitere Untersuchungen bezüglich FoxO3 und einer eventuell bedarfsangepassten Expression anzuschließen.

Im Vergleich der DUhTP-Marathonmäuse mit den DUC-Kontrollmäusen wiesen die DUhTP-Marathonmäuse trainingsunabhängig signifikant höhere Level von SODs sowie Gentranskripten des Glutathionsystems auf. Da eine Stimulation von Mechanismen wie dem Glutathionsystem die antioxidative Kapazität eines Organismus erhöht (Benhar 2020), kann von einer im Vergleich zu DUC-Mäusen verbesserten oxidativen Stressresistenz und damit einhergehend einem geringeren Level an ROS in den DUhTP-Marathonmäusen ausgegangen werden. Es kann vermutet werden,

dass eine erhöhte Transkription von Genen für SODs sowie das Glutathionsystem mit einer verbesserten Ausdauer assoziiert ist.

Interessanterweise wiesen die untrainierten DUhTP-Marathonmäuse ein signifikant verringertes Level des Stress-induzierten HSP70 im Vergleich zu untrainierten DUC-Kontrollmäusen auf. Zwar konnte im Vergleich von trainierten mit untrainierten DUhTP-Marathonmäusen eine deutliche Expressionserhöhung in den trainierten Individuen gesehen werden (*Kap. 4.7.1*), jedoch war das HSP70-Level in trainierten DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu trainierten DUC-Kontrollmäusen niedriger. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass in DUhTP-Marathonmäusen sowohl mit als auch ohne Training weniger ROS im Muskelgewebe vorliegen, die oxidativen Stress und damit eine erhöhte Transkription von Genen für HSP70 bewirken.

5.7 Angewandte Methodik

Die in dieser Studie analysierte Gesamt-RNA wurde aus dem M. rectus femoris von jeweils 8 DUhTP-Marathonmäusen mit und ohne Laufbandtraining sowie jeweils 8 DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Laufbandtraining gewonnen. Es wurde ein Inzucht-freies Mausmodell verwendet, um die interindividuellen Unterschiede und genetische Heterogenität besser darstellen zu können (Tuttle et al. 2018). Dieser Ansatz ermöglicht einerseits zwar einen umfassenderen Überblick über interindividuell unerschiedliche Transkriptomveränderungen, resultiert andererseits jedoch in einer hohen Daten-Variabilität: Verschiedene genetische Varianten in den Promotorregionen von Genen führen womöglich dazu, dass ein DEG je nach betrachtetem Individuum von unterschiedlich starker Bedeutung ist. Die Individuenzahl von $n=8$ pro Gruppe müsste jedoch noch deutlich erhöht werden, um diesbezüglich validere Aussagen treffen zu können. So ergab eine Power-Analyse, dass beispielsweise eine Fallzahl von 18 Mäusen pro Gruppe nötig ist, um den beobachteten Expressionsunterschied des Proteins IGF1R zwischen DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit einer statistischen Power von 80% und auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zu bestätigen.

Eine besondere Herausforderung dieser Arbeit stellt die Übertragung der aus dem Mausmodell gemachten Beobachtungen auf den Menschen dar: Der Protein-kodierende Bereich der Maus hat zwar mit ca. 85% viele Gemeinsamkeiten mit dem humanen Genom, eine direkte Übertragung auf den Menschen (ENCODE Project Consortium et al. 2020) ist dennoch nicht möglich. Ob die im Vergleich der Mausgruppen detektierten DEGs die gleiche Funktion wie im Menschen erfüllen, kann nur spekuliert werden. Auch können Bereiche des murinen Genoms, die im Humangenom per se scheinbar keine Funktion erfüllen, durchaus auch noch unbekannte Funktionen haben. Nichtsdestotrotz stellt das Mausmodell eine gute Möglichkeit dar, die Auswirkungen eines Ausdauertrainings auf die Genexpression des Muskels unter kontrollierten Bedingungen und *in*

vivo darzustellen. Das Tiermodell kann darüber hinaus genutzt werden, Hypothesen für humane Experimente zu generieren.

Die Trainingsintervention erfolgte über einen Zeitraum von drei Wochen (30 min/d (DUhTP) bzw. 15 min/d (DUC); 5d/Woche). In Studien am Menschen sowie am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des Muskeltranskriptoms zwar bereits nach einmaliger Belastung erfolgen, für eine längerfristige kardiovaskuläre und metabolische Anpassungsreaktion jedoch ein Mindestzeitraum von 2 - 3 Wochen gegeben sein muss (Andersen und Henriksson 1977; Manzanares et al. 2018; Popov et al. 2018). Dementsprechend wurde der gewählte Trainingszeitraum für das Mausmodell auf drei Wochen festgesetzt. Die über RNASeq erhaltenen Transkriptomdaten wurden einander in vier Vergleichen gegenübergestellt, um die Auswirkungen eines Ausdauertrainings einerseits und einer Ausdauerselektion andererseits auf das Muskeltranskriptom darstellen zu können: So konnten durch den Vergleich der trainierten mit den untrainierten Individuen einer Mauslinie (DUhTP-Marathonmaus bzw. DUC-Kontrollmaus) trainingsbedingte Veränderungen auf Transkriptomebene dargestellt werden. Selektionsbedingte Anpassungsvorgänge wurden im Vergleich der DUhTP-Marathonmäuse mit den DUC-Kontrollmäusen messbar gemacht.

Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass bei einer deutlich geringeren Lebenserwartung der DUhTP-Marathonmäuse im Vergleich zum Menschen auch die Trainingsdauer von drei Wochen nicht mit drei Wochen im Leben eines Menschen gleichgesetzt werden kann: So entsprechen drei Wochen Training im Leben einer erwachsenen Maus ca. 8 Jahre im Leben eines Menschen (Dutta und Sengupta 2015). Es kann also vermutet werden, dass, um vergleichbare Transkriptomveränderungen im Menschen zu bewirken, die Trainingsdauer deutlich erhöht werden müsste.

Eine besondere Herausforderung der Transkriptomanalyse stellt die Instabilität der Transkripte dar (Blumberg et al. 2019). Um eine suffiziente RNA-Qualität zu gewährleisten, wurden nur Proben mit einer RNA-Integritätszahl > 8 für die Erstellung der DNA-Bibliothek verwendet (Schroeder et al. 2006). Zur Minimierung von Batch-Effekten wurde zusätzlich darauf geachtet, dass sowohl die RNA-Isolation als auch die RNA-Sequenzierung aller Muskelproben innerhalb eines Tages und unter standardisierten Bedingungen erfolgte (Murani et al. 2019). Wie von Rajkumar et al. empfohlen, erfolgte eine Validierung der RNASeq-Ergebnisse mittels qPCR (Rajkumar et al. 2015). Die Validierung mittels qPCR lieferte trotz der Verwendung des etablierten Fluidigm® BioMark HD-Systems und der Normalisierung der Expressionsdaten mit Hilfe von vier verschiedenen Haushaltsgenen (*Actb*, *Pgk1*, *Rpl26* und *Rplp2*; Wang et al. 2019) eine mittlere bis hohe Korrelation beider Messmethoden. Eine mögliche Fehlerquelle stellt die Auswahl der Primer dar (Schmelztemperatur, GC-Gehalt, Amplikonlänge): Bei ungünstiger Lokalisierung der Primer

können Spleißvarianten oder genetische Varianten in den betrachteten Mausgruppen das Messergebnis der qPCR verzerren. Darüber hinaus wurden teils sehr niedrig exprimierte Gene für die Auswahl der Primer verwendet. Aus diesem Grund wurde sich in der vorliegenden Arbeit vorrangig auf die mittels RNASeq erhaltenen Expressionsdaten fokussiert und zusätzlich molekularbiologische Messungen auf Proteinebene angeschlossen.

Um eine vorläufige Auswahl von DEGs anhand der RNASeq-Ergebnisse zu generieren, wurde der p-Wert als zwar nur mäßig stringente aber suffiziente Methode verwendet (Shi et al. 2008). Unter zusätzlicher Einbeziehung des \log_2FC als Maß für die Stärke der Expressionsveränderung wurde der endgültige Satz an DEGs in allen Vergleichen generiert (Khan et al. 2016). Die Funktion und Interaktion der DEGs miteinander konnte anhand der etablierten bioinformatischen Software IPA analysiert werden.

Die Anwendung von IPA zur Signalweganalyse hängt jedoch von Annotationen ab, die bereits in der bestehenden IPKB zu finden sind, wie z. B. der Zugehörigkeit von Gensätzen zu Signalwegen oder der Präsenz von Genen in diversen Netzwerken. Diese Annotationen sind jedoch weit davon entfernt, vollständig zu sein und berücksichtigen weder Zelltyp noch Kompartiment. Die Cutoffs, die dazu dienen, zu gering ausgeprägte Expressionsunterschiede im Vorfeld der IPA-Analyse herauszufiltern, sorgen auch dafür, dass minimal weniger signifikante Gene (z.B. $FC = 1,999$ oder $FDR = 0,05$) übersehen werden. Daraus resultiert ein Informationsverlust. Darüber hinaus können Transkripte desselben Gens aufgrund von posttranskriptionellen Modifikationen wie z.B. alternatives Spleißen ähnliche, unterschiedliche oder sogar gegensätzliche Funktionen haben (Wang et al. 2008). Die IPKB als Wissensgrundlage der visualisierten Geninteraktionen und Netzwerke spezifiziert jedoch nur, welche Gene in einem bestimmten Signalweg aktiv sind. Es ist wichtig, dass jedoch auch andere Informationen dargestellt werden, wie z. B. die spezifischen Transkripte, die in einem bestimmten Signalweg aktiv sind. Nichtsdestotrotz ermöglicht IPA einen umfangreichen Überblick über die Vielfalt der ermittelten DEGs des Datensatzes und ihre Interaktionen miteinander, indem sie die Komplexität der verfügbaren Informationen reduziert und grafisch darstellt.

Die erfolgte Transkriptommessung des Oberschenkelmuskels *M. rectus femoris* mittels RNASeq bot eine gute Möglichkeit, die Auswirkungen von Ausdauertraining einerseits und Ausdauerselektion andererseits auf den Skelettmuskel umfassend zu analysieren. In nachfolgenden Studien wäre eine Untersuchung mittels *Single-cell RNA sequencing* sicherlich interessant, da sich die Expression einzelner Gene zum Teil erheblich zwischen den Zellen des Muskelgewebes unterscheidet (Blackburn et al. 2019). Über die Analyse des Muskeltranskriptomts können darüber hinaus zwar Expressionsunterschiede widerspiegelt werden, Rückschlüsse auf die entsprechende Proteinmenge *in vivo* können jedoch nur bedingt gezogen werden (Guo et al. 2008). Aus diesem

Diskussion

Grund schlossen sich den RNASeq-Analysen in der vorliegenden Arbeit zusätzliche molekularbiologische Untersuchungen auf Proteinebene (Kapillar-Immunoblot, Western Blot, Enzymaktivitätsmessungen) an.

6 Zusammenfassung

Die motorische Fähigkeit, eine definierte körperliche Aktivität über einen möglichst langen Zeitraum und mit einer bestimmten Intensität aufrechtzuerhalten, fasst man unter dem Begriff der Ausdauer zusammen. Ausdauertraining ist ein Training, das mit dem Ziel absolviert wird, diese Ausdauer zu verbessern. Die Fähigkeit eines Organismus, eine bestimmte Ausdauerleistung zu erbringen, ist Resultat der individuellen genetischen Veranlagung, eines gezielten Ausdauertrainings sowie umweltbedingter Einflüsse. Der Skelettmuskel als das die Bewegung ausführende Organsystem spiegelt die Einflüsse eines Trainings einerseits und der Genetik andererseits in besonderem Maße wider. Selektions- und belastungsabhängige Anpassungsvorgänge wirken sich auf das Transkriptomprofil von Skelettmuskelzellen aus.

Eine Möglichkeit, die Auswirkungen einer Ausdauerselektion zu untersuchen, bot das Mausmodell der über mehrere Generationen auf herausragende Ausdauer selektierten *Dummerstorf high Treadmill Performance* (DUhTP)-Marathonmäuse. Um die Auswirkungen der Ausdauerselektion auf die muskuläre Genexpression zu erfassen, wurden nicht-selektierte Kontrollen, die DUC-Kontrollmäuse, als Referenz hinzugezogen. Beide Mauslinien entstammten der gleichen Ursprungslinie. Neben den selektionsbedingten Anpassungsvorgängen des Muskeltranskriptoms erfolgte eine Betrachtung trainingsassoziiierter Veränderungen. Dafür absolvierte jeweils eine Gruppe von Mäusen beider Linien ein 3-wöchiges Laufbandtraining.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Langzeitselektion einerseits sowie des Laufbandtrainings andererseits auf die Genexpression und den Phänotyp des Muskels von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen zu untersuchen.

Mit Hilfe eines *Next Generation Sequencing* (NGS)-Verfahrens wurden im Oberschenkelmuskel *M. rectus femoris* die Unterschiede des Transkriptomprofils von DUhTP-Marathonmäusen im Vergleich zu unselektierten DUC-Kontrollmäusen untersucht. Das betrachtete Mauskollektiv von insgesamt 32 Mäusen setzte sich zu gleichen Teilen aus DUhTP-Marathonmäusen (n=16) und DUC-Kontrollmäusen (n=16) zusammen, von denen jeweils 8 Tiere einer Mauslinie (DUhTP-Marathonmauslinie und DUC-Kontrollmauslinie) zusätzlich das Laufbandtraining absolvierten. Im NGS-Experiment wurde die Expression von insgesamt etwa 14000 Genen gemessen. Die differentielle Expression dieser Gene wurde in vier Vergleichen betrachtet. Zum einen wurden die differentiell exprimierten Gene (DEGs) zwischen untrainierten (*sedentary*, sed) DUhTP-Marathonmäusen (DUhTP_sed; n=8) und untrainierten DUC-Kontrollmäusen (DUC_sed; n=8) ermittelt. Zum anderen wurde die muskuläre Genexpression sowohl in trainierten (*treadmill*, TM) und untrainierten Kontrollmäusen (DUC_TM, n=8; DUC_sed, n=8) als auch in trainierten und untrainierten DUhTP-Marathonmäusen (DUhTP_TM, n=8; DUhTP_sed, n=8) verglichen.

Zusammenfassung

Außerdem erfolgte ein Direktvergleich von trainierten DUhTP-Marathonmäusen mit trainierten DUC-Kontrollmäusen im vierten Vergleich (DUhTP_TM vs DUC_TM). Die anhand der NGS-Daten identifizierten DEGs wurden anhand von molekularbiologischen (Kapillar-Immunoblot, Western Blot, PCR und Enzymaktivitätsmessungen) sowie computergestützten Methoden (Signalwegsanalyse mit IPA) weiter untersucht.

Es konnte gesehen werden, dass die Gruppe der DUhTP-Marathonmäuse sowohl mit (_TM; $0,387 \pm 0,030$ g) als auch ohne Laufbandtraining (_sed; $0,422 \pm 0,035$ g) eine signifikant geringere Oberschenkelmasse als die Gruppe der DUC-Kontrollmäuse (_TM: $0,463 \pm 0,074$ g; _sed: $0,498 \pm 0,043$ g) aufwies. Auf Transkriptomebene konnten im Muskel im Vergleich der trainierten Mäuse beider Linien miteinander numerisch mehr DEGs ($n=7762$) als im Vergleich der trainierten mit untrainierten Individuen einer Linie festgestellt werden (DUhTP: $n=3496$; DUC: $n=1482$). Gene, für die besonders große Expressionsunterschiede gemessen wurden ($|\log_2FC| \geq 1$), unterschieden sich hinsichtlich ihrer Funktion. Generell zeigte sich, dass das Training andere Auswirkungen als die Langzeitselektion hatte:

Durch das Laufbandtraining stieg der muskuläre Regenerationsbedarf, erkennbar an der vermehrten Expression von Myogenese regulierenden Faktoren (Myogenin, Myogener Faktor 3) und des Proteins Myomaker. So waren diese bei den trainierten DUC-Kontrollmäusen verglichen mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen auf RNA-Ebene signifikant vermehrt exprimiert ($\log_2FC > 1$; $p < 0,05$). Trainingsbedingt zeigten sich außerdem eine signifikant erhöhte Expression des Hitzeschockproteins HSP70 bei DUhTP-Marathonmäusen ($\log_2FC > 2$; $p < 0,001$) und - sowohl bei DUhTP-Marathonmäusen als auch bei DUC-Kontrollmäusen - erhöhte RNA-Level des Entkopplungsproteins UCP2 sowie der Transkriptionsfaktoren Hypoxie-induzierter Faktor und Ankyrin Repeat Domain 1. Diese Proteine spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der (physiologischen) Muskelfunktion unter Belastung.

Bei Vergleich der Individuen der DUhTP-Marathonmauslinie mit denen der DUC-Kontrolllinie konnte die Bedeutsamkeit des mitochondrialen Energiestoffwechsels für eine verbesserte Ausdauer hervorgehoben werden. So zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression von Genen für den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel sowie der mitochondrialen Atmungskette bei den DUhTP-Marathonmäusen verglichen mit DUC-Kontrollmäusen. Eine verbesserte Ausdauer ist daher mit einem gesteigerten mitochondrialen Stoffwechsel, in besonderem Maße mit einer gesteigerten Oxidativen Phosphorylierung, assoziiert. Im Verleich zu DUC-Kontrollmäusen wiesen die DUhTP-Marathonmäusen eine signifikant erhöhte RNA-Expression von antioxidativ wirkenden Enzymen wie Glutathionperoxidase, Glutathion-Reduktase und Superoxiddismutase auf. Zusätzlich war in den DUhTP-Marathonmäusen die Expression enzymatischer Produzenten reaktiver

Sauerstoffspezies (NADPH-Oxidase, Phospholipase A2) im Vergleich zu den DUC-Kontrollmäusen verringert.

Langzeitselktion bewirkt zusammenfassend eine Verringerung der Anfälligkeit für oxidativen Stress, eine Erhöhung des Energiestoffwechsels sowie eine verringerte Muskelmasse. Muskuläre Reparaturmechanismen werden dagegen insbesondere durch ein Training stimuliert.

7 Ausblick

Der Stellenwert der in dieser Arbeit ermittelten DEGs im Zusammenhang mit trainings- und selektionsbedingten Anpassungsvorgängen im Skelettmuskel sollte in zukünftigen Studien konkret untersucht werden. Da in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen erfolgten überwiegend auf Transkriptomenebene erfolgten, müssen weitere Untersuchungen auf Proteinebene ergänzt werden. Eine umfassende Untersuchung der Auswirkungen körperlicher Aktivität auf den gesamten Organismus steht nach der hier erfolgten isolierten Betrachtung des Muskeltranskriptoms noch aus. Aus diesem Grund sollten zukünftig insbesondere die Interaktionen der einzelnen Organe miteinander im Vordergrund stehen. Dabei bietet sich u.a. die nähere Untersuchung von interzellulären Botenstoffen wie Hormonen, Myokinen oder Neurotransmittern an. Auf diese Weise wird man in der Lage sein, genauer zu entschlüsseln, wie transkriptionelle Veränderungen des Muskels auch die anderen Organsysteme beeinflussen. Interessant wäre ebenfalls, die Veränderungen des Transkriptomprofils in Form einer Longitudinalstudie zu betrachten. Statt die Mäuse zu töten, könnten nachfolgende Untersuchungen an aus dem lebenden Organismus entnommenen Muskelbiopsien erfolgen. Auch das Feld des NGS wird fortwährend durch eine zunehmende Anzahl an spezifischeren Hochdurchsatzverfahren wie *Single Cell/ Single Nucleus Transcriptomics* und *Spatial Transcriptomics* ergänzt und eröffnet so neue Möglichkeiten für die Zell-spezifische Transkriptomanalyse (Stahl et al. 2016; Stevenson und Uversky 2019).

Die Möglichkeit, ein Molekül zu finden, das mit einer verbesserten Ausdauer sowie einem erhöhten muskulären Regenerationspotential assoziiert ist, eröffnet darüber hinaus auch Chancen für den Bereich der medizinischen Gentherapie. Die im Bereich der genetisch bedingten spinalen Muskelatrophie schon in Ansätzen etablierte Gentherapie kann so womöglich zukünftig auch bei Alters- oder immobilisationsbedingtem Muskelabbau angewendet werden (Shorrock et al. 2018). Studien diesbezüglich werden aktuell sowohl an gentechnisch veränderten „Marathonmäusen“ als auch an menschlichen Probanden durchgeführt (Fan et al. 2017; Goswami et al. 2019; Shafiee et al. 2018).

Interessant wäre auch, welche Faktoren neben Selektion und Training zusätzlich die Genexpression beeinflussen (Ernährung, Umwelteinflüsse, pharmakologische Interventionen u.a.) und inwieweit die anhand der vorliegenden Daten gesehene transkriptionellen Veränderungen reversibel sind.

Ausblick

Genau hier bietet das DUhTP-Mausmodell in Verbindung mit NGS-Analysen ein umfangreiches Potential für nachfolgende Studien. Eine Zusammenführung der Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen der Untersuchung von Leber-, Fett- und Hirngewebe der DUhTP-Marathonmäuse sollte ebenfalls angeschlossen werden, um mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen Geweben darstellen zu können

8 Literaturverzeichnis

- Ahmetov, I. I.; Egorova, E. S.; Gabdrakhmanova, L. J.; Fedotovskaya, O. N. (2016): Genes and Athletic Performance: An Update. *Medicine and sport science* 61, S. 41–54. DOI: 10.1159/000445240 .
- Ahmetov, I. I.; Rogozkin, V. A. (2009): Genes, athlete status and training—An overview. *Medicine and sport science* 54, S. 43–71. DOI: 10.1159/000235696 .
- Al-Khelaifi, F.; Diboun, I.; Donati, F.; Botrè, F.; Abraham, D.; Hingorani, A.; Albagha, O.; Georgakopoulos, C.; Suhre, K.; Yousri, N. A.; Elrayess, M. A. (2019): Metabolic GWAS of elite athletes reveals novel genetically-influenced metabolites associated with athletic performance. *Sci Rep* 9, S. 19889. DOI: 10.1038/s41598-019-56496-7.
- Allard, J. B.; Duan, C. (2018): IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol* 9, S. 117. DOI: 10.3389/fendo.2018.00117.
- Alscher, R. G.; Erturk, N.; Heath, L. S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53 (372), S. 1331–1341.
- Andersen, P.; Henriksson, J. (1977): Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol* 270 (3), S. 677-90. DOI: 10.1113/jphysiol.1977.sp011975.
- Arsenijevic, D.; Onuma, H.; Pecqueur, C.; Raimbault, S.; Manning, B. S.; Miroux, B. et al. (2000): Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26 (4), S. 435–439. DOI: 10.1038/82565.
- Ballester, M.; Cordon, R.; Folch, J. M. (2013): DAG Expression: High-Throughput Gene Expression Analysis of Real-Time PCR Data Using Standard Curves for Relative Quantification. *PloS One* 8 (11), e80385. DOI: 10.1371/journal.pone.0080385.
- Bardou, P.; Mariette, J.; Escudié, F.; Djemiel, C.; Klopp, C. (2014): jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15 (293), DOI: 10.1186/1471-2105-15-293
- Bazgir, B.; Fathi, R.; Rezazadeh Valojerdi, M.; Mozdziak, P.; Asgari, A. (2017): Satellite Cells Contribution to Exercise Mediated Muscle Hypertrophy and Repair. *Cell J* 18 (4), S. 473–484. DOI: 10.22074/cellj.2016.4714.
- Belvederi Murri, M.; Ekkekakis, P.; Magagnoli, M.; Zampogna, D.; Cattedra, S.; Capobianco, L. et al. (2018): Physical Exercise in Major Depression: Reducing the Mortality Gap While Improving Clinical Outcomes. *Front Psychiatry* 9, S. 762. DOI: 10.3389/fpsy.2018.00762.

- Benhar, M. (2020): Oxidants, Antioxidants and Thiol Redox Switches in the Control of Regulated Cell Death Pathways. *Antioxidants (Basel)* 9 (4), S. 309. DOI: 10.3390/antiox9040309.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 57(1), 289-300. Zugriff am 19. Juni 2020, www.jstor.org/stable/2346101
- Blackburn, D. M.; Lazure, F.; Corchado, A. H.; Perkins, T. J.; Najafabadi, H. S.; v. d. Soleimani (2019): High-resolution genome-wide expression analysis of single myofibers using SMART-Seq. *J Biol Chem* 294 (52), S. 20097–20108. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011506.
- Blaustein, M.; Pérez-Munizaga, D.; Sánchez, M. A.; Urrutia, C.; Grande, A.; Risso, G. et al. (2013): Modulation of the Akt pathway reveals a novel link with PERK/eIF2 α , which is relevant during hypoxia. In: *PloS One* 8 (7), e69668-e69668. DOI: 10.1371/journal.pone.0069668.
- Blumberg, A.; Zhao, Y.; Huang, Y.; Dukler, N.; Rice, E. J.; Krumholz, K. et al. (2019): Characterizing RNA stability genome-wide through combined analysis of PRO-seq and RNA-seq data. *bioRxiv*. DOI: 10.1101/690644
- Bolz, H. J.; Hoischen, A. (2019): NGS: Gestern, heute und morgen. *Med Genet* 31 (2), S. 185–190. DOI: 10.1007/s11825-019-0240-8.
- Brandts, L.; van den Brandt, P. A. (2019): Body size, non-occupational physical activity and the chance of reaching longevity in men and women: findings from the Netherlands Cohort Study. *J Epidemiol Community Health* 73 (3), S. 239–249. DOI: 10.1136/jech-2018-211410.
- Brenmoehl, J.; Albrecht, E.; Komolka, K.; Schering, L.; Langhammer, M.; Hoeflich, A.; Maak, S. (2014): Irisin is elevated in skeletal muscle and serum of mice immediately after acute exercise. *Int J Biol Sci* 10 (3), S. 338–349. DOI: 10.7150/ijbs.7972.
- Brenmoehl, J.; Ohde, D.; Albrecht, E.; Walz, C.; Tuchscherer, A.; Hoeflich, A. (2017): Browning of subcutaneous fat and higher surface temperature in response to phenotype selection for advanced endurance exercise performance in male DUhTP mice. *J Comp Physiol B* 187 (2), S. 361–373. DOI: 10.1007/s00360-016-1036-7.
- Brenmoehl, J.; Ohde, D.; Walz, C.; Schultz, J.; Tuchscherer, A.; Rieder, F. et al. (2015): Dynamics of Fat Mass in DUhTP Mice Selected for Running Performance - Fat Mobilization in a Walk. *Obes Facts* 8 (6), S. 373–385. DOI: 10.1159/000442399.
- Brenmoehl, J.; Walz, C.; Renne, U.; Ponsuksili, S.; Wolf, C.; Langhammer, M. et al. (2013): Metabolic adaptations in the liver of born long-distance running mice. *Med Sci Sports Exerc* 45 (5), S. 841–850. DOI: 10.1249/MSS.0b013e31827e0fca.

- Brinkmann, C.; Przyklenk, A.; Metten, A.; Schiffer, T.; Bloch, W.; Brixius, K.; Gehlert, S. (2017): Influence of endurance training on skeletal muscle mitophagy regulatory proteins in type 2 diabetic men. *Endocr Res* 42 (4), S. 325–330. DOI: 10.1080/07435800.2017.1323914.
- Bryant, N. J.; Gould, G. W. (2020): Insulin stimulated GLUT4 translocation - Size is not everything! *Curr Opin Cell Biol* 65, S. 28–34. DOI: 10.1016/j.ceb.2020.02.006.
- Burton, G. J.; Jauniaux, E. (2011): Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25 (3), S. 287–299. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.
- Cadenas, S. (2018): Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859 (9), S. 940–950. DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.05.019.
- Campos, C. Sotomayor, P.; Jerez, D.; Gonzalez, J.; Schmidt, C. B.; Schmidt, K.; Banzer, W.; Godoy, A. S. (2018): Exercise and prostate cancer: From basic science to clinical applications. *Prostate* 78 (9), S. 639–645. DOI: 10.1002/pros.23502.
- Casuso, R. A.; Huertas, J. R. (2020): The emerging role of skeletal muscle mitochondrial dynamics in exercise and ageing, *Ageing Research Reviews* 101025 (58). DOI: 10.1016/j.arr.2020.101025.
- Cenni, V.; Kojic, S.; Capanni, C.; Faulkner, G.; Lattanzi, G.; Serra, A. J. (2019): Ankrd2 in Mechanotransduction and Oxidative Stress Response in Skeletal Muscle: New Cues for the Pathogenesis of Muscular Laminopathies. *Oxid Med Cell Longev* 2019, S. 7318796. DOI: 10.1155/2019/7318796.
- Chen, B.; You, W.; Wang, Y.; Shan, T. (2020): The regulatory role of Myomaker and Myomixer-Myomerger-Minion in muscle development and regeneration. *Cell Mol Life Sci* 77 (8), S. 1551–1569. DOI: 10.1007/s00018-019-03341-9.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1 (2), S. 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
- Cuthbert, R. L.; Shute, R. J.; Slivka, D. R. (2019): Skeletal muscle cold shock and heat shock protein mRNA response to aerobic exercise in different environmental temperatures. *Temperature (Austin)* 6 (1), S. 77–84. DOI: 10.1080/23328940.2018.1555414.
- Damiano, S.; Muscariello, E.; La Rosa, G.; Di Maro, M.; Mondola, P.; Santillo, M. (2019): Dual Role of Reactive Oxygen Species in Muscle Function: Can Antioxidant Dietary Supplements Counteract Age-Related Sarcopenia? *Int J Mol Sci* 20 (15), S. 3815. DOI: 10.3390/ijms20153815.
- Demine, S.; Renard, P.; Arnould, T. (2019): Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. In: *Cells* 8 (8). DOI: 10.3390/cells8080795.

- Desaulniers, P.; Lavoie, P. A.; Gardiner, P. F. (1998): Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. In: *Neuroreport* 9 (16), S. 3549–3552. DOI: 10.1097/00001756-199811160-00001.
- Dickinson, J. M.; D'Lugos, A. C.; Naymik, M. A.; Siniard, A. L.; Wolfe, A. J.; Curtis, D. R. et al. (2018): Transcriptome response of human skeletal muscle to divergent exercise stimuli. *J Appl Physiol (1985)* 124 (6), S. 1529–1540. DOI: 10.1152/jappphysiol.00014.2018.
- Dietl, G.; Langhammer, M.; Renne, U. (2004): Model simulations for genetic random drift in the outbred strain Fzt:DU. *Arch Anim Breed* 47 (6), S. 595–604. DOI: 10.5194/aab-47-595-2004.
- Dunsky, A. (2019): The Effect of Balance and Coordination Exercises on Quality of Life in Older Adults: A Mini-Review. *Frontiers in aging neuroscience, 11*, S. 318. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00318
- Dutta, S.; Sengupta, P. (2015): Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* 52:244-8. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.025.
- Emaus, A.; Thune, I. (2011): Physical activity and lung cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 186, S. 101–133. DOI: 10.1007/978-3-642-04231-7_5.
- ENCODE Project Consortium; Moore, J. E.; Purcaro, M. J.; Pratt, H. E.; Epstein, C. B.; Shores, N.; Adrian, J.; Kawli, T.; Davis, C. A.; Dobin, A.; Kaul, R.; Halow, J.; Van Nostrand, E. L.; Freese, P.; Gorkin, D. U.; Shen, Y.; He, Y.; Mackiewicz, M.; Pauli-Behn, F.; Williams, B. A.; Weng, Z. (2020): Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature*, 583(7818), S. 699–710. DOI: 10.1038/s41586-020-2493-4.
- Eynon, N.; Ruiz, J. R.; Oliveira, J.; Duarte, J. A.; Birk, R.; Lucia, A. (2011): Genes and elite athletes: a roadmap for future research. *The Journal of Physiology* 589, S. 3063-3070. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.207035.
- Falkenberg, H.; Langhammer, M.; Renne, U. (2000): Comparison of biochemical blood traits after long-term selection on high or low locomotory activity in mice. *Arch Anim Breed* 43 (5), S. 513–522. DOI: 10.5194/aab-43-513-2000.
- Fan, W.; Waizenegger, W.; Lin, C. S.; Sorrentino, V.; He, M.; Wall, C. E. et al. (2017): PPAR δ Promotes Running Endurance by Preserving Glucose. *Cell Metab* 25 (5), 1186-1193.e4. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.04.006.
- Fernandes, J. C. R.; Acuna, S. M.; Aoki, J. I.; Floeter-Winter, L. M.; Muxel, S. M. (2019): Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Noncoding RNA* 5 (1). DOI: 10.3390/ncrna5010017.

- Florez Bedoya, C. A.; Cardoso, A. C. F.; Parker, N.; an Ngo-Huang; Petzel, M. Q.; Kim, M. P. et al. (2019): Exercise during preoperative therapy increases tumor vascularity in pancreatic tumor patients. *Sci Rep* 9 (1), S. 13966. DOI: 10.1038/s41598-019-49582-3.
- Flück, M. (2013): Diagnostics of endurance performance on the level of gene expression. *Sports Orthop Traumatol* 29 (3), S. 203–213. DOI: 10.1016/j.orthtr.2013.07.014.
- Ganassi, M.; Badodi, S.; Ortuste Quiroga, H. P.; Zammit, P. S.; Hinitz, Y.; Hughes, S. M. (2018): Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size. *Nat Commun* 9 (1), S. 4232. DOI: 10.1038/s41467-018-06583-6.
- Gekle, M. (2010): Taschenlehrbuch Physiologie. 70 Tabellen. S. 34-58 Stuttgart: Thieme. Online verfügbar unter <http://ebooks.thieme.de/9783131449818/1>.
- Georgiades, E.; Klissouras, V.; Baulch, J.; Wang, G.; Pitsiladis, Y. (2017): Why nature prevails over nurture in the making of the elite athlete. *BMC genomics* 18, (835), DOI: 10.1186/s12864-017-4190-8.
- Giraldez, M. D.; Spengler, R. M.; Etheridge, A.; Godoy, P. M.; Barczak, A. J.; Srinivasan, S. et al. (2018): Comprehensive multi-center assessment of small RNA-seq methods for quantitative miRNA profiling. *Nat Biotechnol* 36 (8), S. 746–757. DOI: 10.1038/nbt.4183.
- Gokce, E.; Akat, F.; Dursun, A. D.; Gunes, E.; Bayram, P.; Billur, D.; Koc, E. (2019): Effects of eccentric exercise on different slopes. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 19 (4), S. 412–421.
- Goodwin, S.; McPherson, J. D.; McCombie, W. R. (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17 (6), S. 333–351. DOI: 10.1038/nrg.2016.49.
- Goswami, R.; Subramanian, G.; Silayeva, L.; Newkirk, I.; Doctor, D.; Chawla, K. et al. (2019): Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Front Oncol* 9, S. 297. DOI: 10.3389/fonc.2019.00297.
- Graf, C.; Wessely, N. (2010): Physical Activity in the Prevention and Therapy of Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 5 (6), S. 389–394. DOI: 10.1159/000322650.
- Guertin, D. A.; Stevens, D. M.; Thoreen, C. C.; Burds, A. A.; Kalaany, N. Y.; Moffat, J. et al. (2006): Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 11 (6), S. 859–871. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.10.007.
- Guo, Y.; Xiao, P.; Lei, S.; Deng, F.; Xiao, G. G.; Liu, Y. et al. (2008): How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40 (5), S. 426–436. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008.00418.x.

- Handschin, C.; Chin, S.; Li, P.; Liu, F.; Maratos-Flier, E.; Lebrasseur, N. K. et al. (2007): Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 282 (41), S. 30014–30021. DOI: 10.1074/jbc.M704817200.
- Harvey, S. B.; Overland, S.; Hatch, S. i L.; Wessely, S.; Mykletun, A.; Hotopf, M. (2018): Exercise and the Prevention of Depression: Results of the HUNT Cohort Study. *Am J Psychiatry* 175 (1), S. 28–36. DOI: 10.1176/appi.ajp.2017.16111223.
- Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L.; Löffler, G. (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. S. 234-280. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Henríquez-Olguin, C.; Knudsen, J. R.; Raun, S. H.; Li, Z.; Dalbram, E.; Treebak, J. T. et al. (2019): Cytosolic ROS production by NADPH oxidase 2 regulates muscle glucose uptake during exercise. *Nat Com* 10 (1), S. 4623. DOI: 10.1038/s41467-019-12523-9.
- Hernandez-Hernandez, J. M.; Garcia-Gonzalez, E. G.; Brun, C. E.; Rudnicki, M. A. (2017): The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 72, S. 10–18. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.11.010.
- Hert, D. G.; Fredlake, C. P.; Barron, A. E. (2008): Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* 29 (23), S. 4618–4626. DOI: 10.1002/elps.200800456.
- Hohmann, A.; Lames, M.; Letzelter, M. (2014): Einführung in die Trainingswissenschaft. S. 53-60. 6., unveränderte Auflage. Wiebelsheim: Limpert Verlag.
- Hollmann, W.; Hettinger, T. (1990): Sportmedizin. Arbeits- und Trainingsgrundlagen. 3., korrigierte Auflage. S.20f. Stuttgart, New York: Schattauer
- Horn, F. (2019): Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Unter Mitarbeit von Isabelle Moc, Paul Ziegler und Silke Berghold. 7., korrigierte Auflage. S. 115-260. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. Online verfügbar unter <https://eref.thieme.de/ebooks/2373922>.
- Houweling, P. J.; Berman, Y. D.; Turner, N.; Quinlan, K. G. R.; Seto, J. T.; Yang, N. et al. (2017): Exploring the relationship between α -actinin-3 deficiency and obesity in mice and humans. *Int J Obes* 41 (7), S. 1154–1157. DOI: 10.1038/ijo.2017.72.
- Howald, H.; Hoppeler, H.; Claassen, H.; Mathieu, O.; Straub, R. (1985): Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch* 403 (4), S. 369–376. DOI: 10.1007/bf00589248.
- Ikeda, S.; Kamikawa, Y.; Ohwatashi, A.; Harada, K.; Yoshida, A. (2013): The effect of anabolic steroid administration on passive stretching-induced expression of mechano-growth factor in skeletal muscle. *ScientificWorldJournal* 2013, S. 313605. DOI: 10.1155/2013/313605.

- Incalza, M. A.; D'Oria, R.; Natalicchio, A.; Perrini, S.; Laviola, L.; Giorgino, F. (2018): Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* 100, S. 1–19. DOI: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
- Islam, H.; Edgett, B. A.; Gurd, B. J. (2018): Coordination of mitochondrial biogenesis by PGC-1alpha in human skeletal muscle: A re-evaluation. *Metabolism* 79, S. 42–51. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.11.001.
- Ježek, P.; Holendová, B.; Plecítá-Hlavatá, L. (2020): Redox Signaling from Mitochondria: Signal Propagation and Its Targets. *Biomolecules* 10 (1), S. 93. DOI: 10.3390/biom10010093.
- Kalamida, D.; Poulas, K.; Avramopoulou, V.; Fostieri, E.; Lagoumintzis, G.; Lazaridis, K. et al. (2007): Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J* 274 (15), S. 3799–3845. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x.
- Kamps, R.; Brandão, R. D.; van den Bosch, B. J.; Paulussen, A. D. C.; Xanthoulea, S.; Blok, M. J.; Romano, A. (2017): Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci* 18 (2), S. 308. DOI: 10.3390/ijms18020308.
- Kazyken, D.; Magnuson, B.; Bodur, C.; Acosta-Jaquez, H. A.; Zhang, D.; Tong, X. et al. (2019): AMPK directly activates mTORC2 to promote cell survival during acute energetic stress. *Sci Signal* 12 (585). DOI: 10.1126/scisignal.aav3249.
- Keul, J.; Doll, E.; Keppler, D. (1969): Muskelstoffwechsel: Die Energiebereitstellung im Skelettmuskel als Grundlage seiner Funktion: Barth (Wissenschaftliche Schriftenreihe des Deutschen Sportbundes). S. 236-250 Online verfügbar unter https://books.google.de/books?id=z_QFoQEACAAJ.
- Khan, M. I.; Czarnecka, A. M.; Lewicki, S.; Helbrecht, I.; Brodaczewska, K.; Koch, I. et al. (2016): Comparative Gene Expression Profiling of Primary and Metastatic Renal Cell Carcinoma Stem Cell-Like Cancer Cells. *PLoS One* 11 (11), e0165718-e0165718. DOI: 10.1371/journal.pone.0165718.
- Kim, D.; Langmead, B.; Salzberg, S. L. (2015): HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12 (4), S. 357–360. DOI: 10.1038/nmeth.3317.
- Koishi, K.; Zhang, M.; McLennan, I. S.; Harris, A. J. (1995): MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev Dyn* 202 (3), S. 244–254. DOI: 10.1002/aja.1002020304.
- Kops, G. J. P. L.; Dansen, T. B.; Polderman, P. E.; Saarloos, I.; Wirtz, K. W. A.; Coffey, P. J. et al. (2002): Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419 (6904), S. 316–321. DOI: 10.1038/nature01036.

- Kukurba, K. R.; Montgomery, S. B. (2015): RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* 2015 (11), S. 951–969. DOI: 10.1101/pdb.top084970.
- Lai, C.; Tu, Y.; Wang, T.; Huang, Y.; Chien, K. (2018): Effects of resistance training, endurance training and whole-body vibration on lean body mass, muscle strength and physical performance in older people: a systematic review and network meta-analysis. *Age Ageing*. 2018;47(3):367-373. doi:10.1093/ageing/afy009
- Laurens, C.; Bergouignan, A.; Moro, C. (2020): Exercise-Released Myokines in the Control of Energy Metabolism. *Front Physiol* 11, S. 91. DOI: 10.3389/fphys.2020.00091.
- Lindqvist, J.; Levy, Y.; Pati-Alam, A.; Hardeman, E. C.; Gregorevic, P.; Ochala, J. (2016): Modulating myosin restores muscle function in a mouse model of nemaline myopathy. *Ann Neurol* 79 (5), S. 717–725. DOI: 10.1002/ana.24619.
- Ling, S. S. M.; Chen, Y.; Wang, J.; Richards, A. M.; Liew, O. W. (2017): Ankyrin Repeat Domain 1 Protein: A Functionally Pleiotropic Protein with Cardiac Biomarker Potential. *Int J Mol Sci* 18 (7), S. 1362. DOI: 10.3390/ijms18071362.
- Linnarsson, S. (2010): Recent advances in DNA sequencing methods - general principles of sample preparation. *Exp Cell Res* 316 (8), S. 1339–1343. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.036.
- Liskutin, T.; Batey, J.; Li, R.; Schweigert, C.; Mestril, R. (2020): Increased heat shock protein expression decreases inflammation in skeletal muscle during and after frostbite injury. *Curr Mol Med*. DOI: 10.2174/1566524020666200407083131.
- Liu, W. Y.; He, W.; Li, H. (2013): Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxid Med Cell Longev* 2013, S. 780719. DOI: 10.1155/2013/780719.
- Liu, Y.; Steinacker, J. M. (2002): Role of HSP in skeletal muscle. In: *German Journal of Sports Medicine* 53 (12), S. 361–367.
- Lösel, D.; Franke, A.; Kalbe, C. (2013): Comparison of different skeletal muscles from growing domestic pigs and wild boars. *Arch Anim Breed*. 56 (1), S. 766–777. DOI: 10.7482/0003-9438-56-076.
- Ludlow, A. T.; Gratidao, L.; Ludlow, L. W.; Spangenburg, E. E.; Roth, S. M. (2017): Acute exercise activates p38 MAPK and increases the expression of telomere-protective genes in cardiac muscle. *Exp Physiol* 102 (4), S. 397–410. DOI: 10.1113/EP086189.
- Lüllmann-Rauch, R.; Asan, E. (2015): Taschenlehrbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. S. 212-237. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Thieme E-Book Library Studium & Lehre). Online verfügbar unter <https://eref.thieme.de/ebooks/2100626>.

- Lundby, C.; Gassmann, M.; Pilegaard, H. (2006): Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol* 96 (4), S. 363–369. DOI: 10.1007/s00421-005-0085-5.
- MacKnight, J. M. (2017): Osteopenia and Osteoporosis in Female Athletes. *Clin Sports Med* 36 (4), S. 687–702. DOI: 10.1016/j.csm.2017.05.006.
- Mahler Convenor, M.; Berard, M.; Feinstein, R.; Gallagher, A.; Illgen-Wilcke, B.; Pritchett-Corning, K.; Raspa, M. (2014): FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 48 (3), S. 178–192. DOI: 10.1177/0023677213516312.
- Manning, B. D.; Toker, A. (2017): AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169 (3), S. 381–405. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
- 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* 52(1). DOI: 10.1590/1414-431X20187830.
- Marcon, B. H.; Spangenberg, L.; Bonilauri, B.; Robert, A. W.; Angulski, A. B. B.; Cabo, G. C. et al. (2019): Data describing the experimental design and quality control of RNA-Seq of human adipose-derived stem cells undergoing early adipogenesis and osteogenesis. *Data Brief* 28, S. 105053. DOI: 10.1016/j.dib.2019.105053.
- Mardis, E. R. (2006): Anticipating the 1,000 dollar genome. *Genome Biol* 7 (7), S. 112. DOI: 10.1186/gb-2006-7-7-112.
- Mardis, E. R. (2011): A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470 (7333), S. 198–203. DOI: 10.1038/nature09796.
- Maxam, A. M.; Gilbert, W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (2), S. 560–564. DOI: 10.1073/pnas.74.2.560.
- Mills, M.; Yang, N.; Weinberger, R.; Vander Woude, D. L.; Beggs, A. H.; Easteal, S.; North, K. (2001): Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet* 10 (13), S. 1335–1346. DOI: 10.1093/hmg/10.13.1335.
- Milward, E. A.; Shahandeh, A.; Heidari, M.; Johnstone, D. M.; Daneshi, N.; Hondermarck, H. (2016): Transcriptomics. *Encyclopedia of Cell Biology*. S. 160-165. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-394447-4.40029-5.

- Mix, E.; Zettl, U. K.; Zielasek, J.; Hartung, H. P.; Gold, R. (1999): Apoptosis induction by macrophage-derived reactive oxygen species in myelin-specific T cells requires cell-cell contact. *J Neuroimmunol* 95(1-2), S. 152-156. DOI: 10.1016/s0165-5728(99)00006-5.
- Mookerjee, S. A.; Gerencser, A. A.; Nicholls, D. G.; Brand, M. D. (2017): Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *J Biol Chem* 292 (17), S. 7189–7207. DOI: 10.1074/jbc.M116.774471.
- Morin, R.; Bainbridge, M.; Fejes, A.; Hirst, M.; Krzywinski, M.; Pugh, T. et al. (2008): Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques* 45 (1), S. 81–94. DOI: 10.2144/000112900.
- Morissette, M. R.; Cook, S. A.; Buranasombati, C.; Rosenberg, M. A.; Rosenzweig, A. (2009): Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *Am J Physiol Cell Physiol* 297 (5), C1124-32. DOI: 10.1152/ajpcell.00043.2009.
- Mujika, I.; Ronnestad, B. R.; Martin, D. T. (2016): Effects of Increased Muscle Strength and Muscle Mass on Endurance-Cycling Performance. *Int J Sports Physiol Perform* 11 (3), S. 283–289. DOI: 10.1123/IJSPP.2015-0405.
- Murani, E.; Trakooljul, N.; Hadlich, F.; Ponsuksili, S.; Wimmers, K. (2019): Transcriptome Responses to Dexamethasone Depending on Dose and Glucocorticoid Receptor Sensitivity in the Liver. *Front Genet* 10, S. 559. DOI: 10.3389/fgene.2019.00559.
- Northey, J. M.; Cherbuin, N.; Pumpa, K. L.; Smee, D. J.; Rattray, B. (2018): *Br J Sports Med.* 2018;52(3):154-160. DOI:10.1136/bjsports-2016-096587.
- Nyunt, T.; Britton, M.; Wanichthanarak, K.; Budamagunta, M.; Voss, J. C.; Wilson, D. W. et al. (2019): Mitochondrial oxidative stress-induced transcript variants of ATF3 mediate lipotoxic brain microvascular injury. *Free Radic Biol Med* 143, S. 25–46. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.024.
- Ohde, D.; Moeller, M.; Brenmoehl, J.; Walz, C.; Ponsuksili, S.; Schwerin, M. et al. (2016): Advanced Running Performance by Genetic Predisposition in Male Dummerstorf Marathon Mice (DUhTP) Reveals Higher Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) Related mRNA Expression in the Liver and Higher Serum Levels of Progesterone. *PLoS One* 11 (1), e0146748. DOI: 10.1371/journal.pone.0146748.
- Oruc, Z.; Kaplan, M. A. (2019): Effect of exercise on colorectal cancer prevention and treatment. *World J Gastrointest Oncol* 11 (5), S. 348–366. DOI: 10.4251/wjgo.v11.i5.348.
- Pape, H. C.; Kurtz, A.; Silbernagl, S. (2019): Physiologie. 9., vollständig überarbeitete Auflage. S. 137-155

- Pertea, M.; Kim, D.; Pertea, G. M.; Leek, J. T.; Salzberg, S. L. (2016): Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* 11 (9), S. 1650–1667. DOI: 10.1038/nprot.2016.095.
- Peterson, G. L. (1977): A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83 (2), S. 346–356. DOI: 10.1016/0003-2697(77)90043-4.
- Pillon, N. J.; Gabriel, B. M.; Dollet, L.; Smith, J. A. B.; Puig, L. S.; Botella, J.; Bishop, D. J.; Krook, A.; Zierath, J. R. (2020): Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to exercise and inactivity. *Nat Commun* 11, S. 470. DOI: 10.1038/s41467-019-13869-w
- Pitsiladis, Y. P.; Tanaka, M.; Eynon, N.; Bouchard, C.; North, K. N.; Williams, A. G.; Collins, M.; Moran, C. N.; Britton, S. L.; Fiku, N.; Ashley, E. A.; Klissouras, V.; Lucia, A.; Ahmetov, I. I.; de Geus, E.; Alsayrafi, M. (2016): Athlome Project Consortium: a concerted effort to discover genomic and other “omic” markers of athletic performance. *Physiological genomics* 48, S. 183–190. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00105.2015.
- Potthoff, M. J.; Olson, E. N. (2007): MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134 (23), S. 4131–4140. DOI: 10.1242/dev.008367.
- Potthoff, M. J.; Wu, H.; Arnold, M. A.; Shelton, J. M.; Backs, J.; McAnally, J. et al. (2007): Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J Clin Invest* 117 (9), S. 2459–2467. DOI: 10.1172/JCI31960.
- Psilander, N.; Eftestøl, E.; Cumming, K. T.; Juvkam, I.; Ekblom, M. M.; Sunding, K.; Wernbom, M.; Holmberg, H. C.; Ekblom, B.; Bruusgaard, J. C.; Raastad, T.; Gundersen, K. (1985): Effects of training, detraining, and retraining on strength, hypertrophy, and myonuclear number in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 126(6): S. 1636-1645. DOI: 10.1152/jappphysiol.00917.2018.
- Quinn, C. J.; Hydock, D. S. (2017): Effects of endurance exercise and doxorubicin on skeletal muscle myogenic regulatory factor expression. *Muscles Ligaments Tendons J* 7 (3), S. 418–425. DOI: 10.11138/mltj/2017.7.3.418.
- Radak, Z.; Taylor, A. W.; Ohno, H.; Goto, S. (2001): Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 7, S. 90–107. PMID: 11579750
- Rahman, M. M.; Teng, J.; Worrell, B. T.; Noviello, C. M.; Lee, M.; Karlin, A. et al. (2020): Structure of the Native Muscle-type Nicotinic Receptor and Inhibition by Snake Venom Toxins. *Neuron* DOI: 10.1016/j.neuron.2020.03.012.
- Rajkumar, A. P.; Qvist, P.; Lazarus, R.; Lescai, F.; Ju, J.; Nyegaard, M. et al. (2015): Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. *BMC Genomics* 16 (1), S. 548. DOI: 10.1186/s12864-015-1767-y.

- Raschka, C.; Ruf, S. (2018): Sport und Ernährung. Wissenschaftlich basierte Empfehlungen, Tipps und Ernährungspläne für die Praxis. 4., unveränderte Auflage. S. 63. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Rizzo, J. M.; Buck, M. J. (2012): Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 5 (7), S. 887–900. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0432.
- Robinson, M. D.; McCarthy, D. J.; Smyth, G. K. (2010): edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26 (1), S. 139–140. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Russell, L. K.; Mansfield, C. M.; Lehman, J. J.; Kovacs, A.; Courtois, M.; Saffitz, J. E. et al. (2004): Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* 94 (4), S. 525–533. DOI: 10.1161/01.RES.0000117088.36577.EB.
- Sable, A.; Rai, K. M.; Choudhary, A.; Yadav, V. K.; Agarwal, S. K.; Sawant, S. V. (2018): Inhibition of Heat Shock proteins HSP90 and HSP70 induce oxidative stress, suppressing cotton fiber development. *Sci Rep* 8 (1), S. 3620. DOI: 10.1038/s41598-018-21866-0.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12), S. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Schadler, K. L.; Thomas, N. J.; Galie, P. A.; Bhang, D. H.; Roby, K. C.; Addai, P. et al. (2016): Tumor vessel normalization after aerobic exercise enhances chemotherapeutic efficacy. *Oncotarget* 7 (40), S. 65429–65440. DOI: 10.18632/oncotarget.11748.
- Schiaffino, S.; Mammucari, C. (2011): Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* 1 (1), S. 4. DOI: 10.1186/2044-5040-1-4.
- Schiaffino, S.; Rossi, A. C.; Smerdu, V.; Leinwand, L. A.; Reggiani, C. (2015): Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skelet Muscle* 5, S. 22. DOI: 10.1186/s13395-015-0046-6.
- Schroeder, A.; Mueller, O.; Stocker, S.; Salowsky, R.; Leiber, M.; Gassmann, M. et al. (2006): The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, S. 3. DOI: 10.1186/1471-2199-7-3.
- Sedding, D. G. (2008): FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing--a new fork on the way to longevity? *Biol Chem* 389 (3), S. 279–283. DOI: 10.1515/BC.2008.033.

- Segundo-Val, I. S.; Sanz-Lozano, C. S. (2016): Introduction to the Gene Expression Analysis. *Methods Mol Biol* 1434, S. 29–43. DOI: 10.1007/978-1-4939-3652-6_3.
- Shafiee, G.; Asgari, Y.; Soltani, A.; Larijani, B.; Heshmat, R. (2018): Identification of candidate genes and proteins in aging skeletal muscle (sarcopenia) using gene expression and structural analysis. *PeerJ* 6, e5239-e5239. DOI: 10.7717/peerj.5239.
- Shan, T.; Liu, J.; Xu, Z.; Wang, Y. (2019): Roles of phosphatase and tensin homolog in skeletal muscle. *J Cell Physiol* 234 (4), S. 3192–3196. DOI: 10.1002/jcp.26820.
- Shi, L.; Jones, W. D.; Jensen, R. V.; Harris, S. C.; Perkins, R. G.; Goodsaid, F. M. et al. (2008): The balance of reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies. *BMC Bioinformatics* 9 Suppl 9 (Suppl 9), S10-S10. DOI: 10.1186/1471-2105-9-S9-S10.
- Shorrocks, H. K.; Gillingwater, T. H.; Groen, E. J. N. (2018): Overview of Current Drugs and Molecules in Development for Spinal Muscular Atrophy Therapy. *Drugs* 78 (3), S. 293–305. DOI: 10.1007/s40265-018-0868-8.
- Shrestha, N.; Bahnan, W.; Wiley, D. J.; Barber, G.; Fields, K. A.; Schesser, K. (2012): Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. *J Biol Chem* 287 (34), S. 28738–28744. DOI: 10.1074/jbc.M112.375915.
- Sies, H. (2015): Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4, S. 180–183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
- Slavov, N. (2021): Increasing proteomics throughput. *Nat Biotechnol*. DOI: 10.1038/s41587-021-00881-z
- Slopack, D.; Roudier, E.; Liu, S. T. K.; Nwadozi, E.; Birot, O.; Haas, T. L. (2014): Forkhead BoxO transcription factors restrain exercise-induced angiogenesis. *J Physiol* 592 (18), S. 4069–4082. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.275867.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Sommer, C.; Lee, S.; Gulseth, H. L.; Jensen, J.; Drevon, C. A.; Birkeland, K. I. (2017): Soluble Leptin Receptor Predicts Insulin Sensitivity and Correlates With Upregulation of Metabolic Pathways in Men. *J Clin Endocrinol Metab* 103 (3), S. 1024–1032. DOI: 10.1210/jc.2017-02126.
- Ståhl, P. L.; Salmén, F.; Vickovic, S.; Lundmark, A.; Navarro, J. F.; Magnusson, J. et al. (2016): Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 353 (6294), S. 78. DOI: 10.1126/science.aaf2403.

- Stangel, M.; Mix, E.; Zettl, U. K.; Gold, R. (2001): Oxides and apoptosis in inflammatory myopathies. *Microsc Res Tech* 55(4), S. 249-258. DOI: 10.1002/jemt.1174.
- Staron, R. S.; Hagerman, F. C.; Hikida, R. S.; Murray, T. F.; Hostler, D. P.; Crill, M. T. et al. (2000): Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem* 48 (5), S. 623–629. DOI: 10.1177/002215540004800506.
- Stefanetti, R. J.; Voisin, S.; Russell, A.; Lamon, S. (2018): Recent advances in understanding the role of FOXO3. In: *F1000Res* 7, F1000 Faculty Rev-1372. DOI: 10.12688/f1000research.15258.1.
- Steinbacher, P.; Eckl, P. (2015): Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 5 (2), S. 356–377. DOI: 10.3390/biom5020356.
- Stevenson, K.; Uversky, V. N. (2019): Single-cell RNA-Seq: a next generation sequencing tool for a high-resolution view of the individual cell. *J Biomol Struct Dyn*, S. 1–6. DOI: 10.1080/07391102.2019.1659859.
- Stuart, C. A.; Stone, W. L.; Howell, M. E. A.; Brannon, M. F.; Hall, H. K.; Gibson, A. L.; Stone, M. H. (2016): Myosin content of individual human muscle fibers isolated by laser capture microdissection. *Am J Physiol Cell Physiol* 310 (5), C381-9. DOI: 10.1152/ajpcell.00317.2015.
- Swallow, J. G.; Carter, P. A.; Garland, T., JR (1998): Artificial selection for increased wheel-running behavior in house mice. *Behav Genet* 28 (3), S. 227–237. DOI: 10.1023/a:1021479331779.
- Talbot, J.; Maves, L. (2016): Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5 (4), S. 518–534. DOI: 10.1002/wdev.230.
- Tam, V., Patel, N., Turcotte, M. (2019): Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 20, S. 467–484. DOI: 10.1038/s41576-019-0127-1.
- Thamilarasan, M.; Koczan, D.; Hecker, M.; Paap, B.; Zettl, U. K. (2012): MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev* 11(3), S. 174-179. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.05.009.
- Thompson, Z.; Argueta, D.; Garland, T., JR; DiPatrizio, N. (2017): Circulating levels of endocannabinoids respond acutely to voluntary exercise, are altered in mice selectively bred for high voluntary wheel running, and differ between the sexes. *Physiol Behav* 170, S. 141–150. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.11.041.
- Tipton, K. D.; Wolfe, R. R. (2001): Exercise, protein metabolism, and muscle growth. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11 (1), S. 109–132. DOI: 10.1123/ijnsnem.11.1.109.

- Tsai, S.; Tung, Y.; Chen, H.; Shen, C.; Chuang, C.; Tang, T.; Chen, C. (2013): Treadmill running upregulates the expression of acetylcholine receptor in rat gastrocnemius following botulinum toxin A injection. *J Orthop Res* 31 (1), S. 125–131. DOI: 10.1002/jor.22180.
- Tuttle A. H.; Philip V. M.; Chesler E. J.; Mogil J. S. (2018): Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat Methods* 15 (12), S. 994-996. DOI: 10.1038/s41592-018-0224-7.
- Vargas, S.; Petro, J. L.; Romance, R.; Bonilla, D. A.; Florido, M. A.; Kreider, R. B. et al. (2019): Comparison of changes in lean body mass with a strength- versus muscle endurance-based resistance training program. *Eur J Appl Physiol* 119 (4), S. 933–940. DOI: 10.1007/s00421-019-04082-0.
- Wang, E. T.; Sandberg, R.; Luo, S.; Khrebtkova, I.; Zhang, L.; Mayr, C.; Kingsmore, S. F.; Schroth, G. P.; Burge, C. B. (2008): Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 456(7221). S. 470-476. DOI: 10.1038/nature07509.
- Wang, M.; Liu, Y.; Liang, Y.; Naruse, K.; Takahashi, K. (2021): Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions-Diabetes Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Cardiovasc Med* 8:649785. DOI: 10.3389/fcvm.2021.649785.
- Wang, X.; Spandidos, A.; Wang, H.; Seed, B. (2012): PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res* 40 (Database issue), D1144-9. DOI: 10.1093/nar/gkr1013.
- Wang, X.; Zhao, H.; Ni, J.; Pan, J.; Hua, H.; Wang, Y. (2019): Identification of suitable reference genes for gene expression studies in rat skeletal muscle following sciatic nerve crush injury. *Mol Med Rep* 19 (5), S. 4377-4387. DOI: 10.3892/mmr.2019.10102
- Wang, Y.; Xu, W.; Yan, Z.; Zhao, W.; Mi, J.; Li, J.; Yan, H. (2018): Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J Exp Clin Cancer Res : CR* 37 (1), S. 63. DOI: 10.1186/s13046-018-0731-5.
- Wei, Y. H.; Lu, C. Y.; Wei, C. Y.; Ma, Y. S.; Lee, H. C. (2001): Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 44 (1), S. 1–11.
- Werner, C. M.; Hecksteden, A.; Morsch, A.; Zundler, J.; Wegmann, M.; Kratzsch, J. et al. (2019): Differential effects of endurance, interval, and resistance training on telomerase activity and telomere length in a randomized, controlled study. *Eur Heart J* 40 (1), S. 34–46. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy585.

- Wessner, B.; Ploder, M.; Tschan, H.; Ferunaj, P.; Erindi, A.; Strasser, E.; Bachl, N. (2019): Effects of acute resistance exercise on proteolytic and myogenic markers in skeletal muscles of former weightlifters and age-matched sedentary controls. *J Sports Med Phys Fitness* 59 (11), S. 1915–1924. DOI: 10.23736/S0022-4707.19.09740-8.
- Widmann, M.; Nieß, A. M.; Munz, B. (2019): Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. *Sports Med.* 49(4), S. 509-523. DOI: 10.1007/s40279-019-01070-4.
- Wiederstein, J. L.; Nolte, H.; Gunther, S.; Piller, T.; Baraldo, M.; Kostin, S. et al. (2018): Skeletal Muscle-Specific Methyltransferase METTL21C Trimethylates p97 and Regulates Autophagy-Associated Protein Breakdown. *Cell Rep* 23 (5), S. 1342–1356. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.136.
- Wilson, D. J. (2019): Osteoporosis and sport. *Eur J Radiol* 110, S. 169–174. DOI: 10.1016/j.ejrad.2018.11.010.
- Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M. N. (2006): TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124 (3), S. 471–484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016.
- Xiao-Jie, L.; Ai-Mei, G.; Li-Juan, J.; Jiang, X. (2015): Pseudogene in cancer: real functions and promising signature. *J Med Genet* 52 (1), S. 17–24. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102785.
- Yaghoob Nezhad, F.; Verbrugge, S. A. J.; Schonfelder, M.; Becker, L.; Hrabe de Angelis, M.; Wackerhage, H. (2019): Genes Whose Gain or Loss-of-Function Increases Endurance Performance in Mice: A Systematic Literature Review. *Front Physiol* 10, S. 262. DOI: 10.3389/fphys.2019.00262.
- Yeung, A. Y.; Tadi, P. (2020): Physiology, Obesity Neurohormonal Appetite And Satiety Control. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Yilmaz, A.; Grotewold, E. (2010): Components and mechanisms of regulation of gene expression. *Methods Mol Biol* 674, S. 23–32. DOI: 10.1007/978-1-60761-854-6_2.
- Yoo, S. Z.; No, M. H.; Heo, J. W.; Park, D. H.; Kang, J. H.; Kim, S. H.; Kwak, H. B. (2018): Role of exercise in age-related sarcopenia. *Journal of exercise rehabilitation*, 14(4), S. 551–558. DOI: 10.12965/jer.1836268.134
- Youm, T. H.; Woo, S.; Kwon, E.; Park, S. S. (2019): NADPH Oxidase 4 Contributes to Myoblast Fusion and Skeletal Muscle Regeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2019, S. 3585390. DOI: 10.1155/2019/3585390.
- Zhao, S.; Fung-Leung, W.; Bittner, A.; Ngo, K.; Liu, X. (2014): Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PloS One* 9 (1), e78644. DOI: 10.1371/journal.pone.0078644.

- Zheng, J.; Liu, W.; Zhu, X.; Ran, L.; Lang, H.; Yi, L. et al. (2020): Pterostilbene Enhances Endurance Capacity via Promoting Skeletal Muscle Adaptations to Exercise Training in Rats. *Molecules* 25 (1), S. 186. DOI: 10.3390/molecules25010186.
- Zhou, X.; Wei, X.; Li, S.; Liu, R.; Yu, M.; Zhao, Y. (2019): Interactions between Cytosolic Phospholipase A2 Activation and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in the Development of Ventilator-Induced Diaphragm Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2019, S. 2561929. DOI: 10.1155/2019/2561929.
- Zhou, Y.; Li, C.; Li, R.; Zhou, C. (2018): Exercise improves nicotine reward-associated cognitive behaviors and related alpha7 nAChR-mediated signal transduction in adolescent rats. *J Cell Physiol* 233 (8), S. 5756–5767. DOI: 10.1002/jcp.26295.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Muskelfasertypen	3
Tab. 2:	Aktueller Kenntnisstand zu physiologischen und molekularen Besonderheiten der DUhTP-Marathonmauslinie	14
Tab. 3:	Chemikalien	17
Tab. 4:	Kits	18
Tab. 5:	Primer	19
Tab. 6:	Antikörper	22
Tab. 7:	Geräte	23
Tab. 8:	Weitere Verbrauchsmaterialien	23
Tab. 9:	Phänotypische Kenngrößen der untersuchten Mausgruppen	40
Tab. 10:	Anzahl unterschiedlich exprimierter Transkriptionsprodukte im Gruppenvergleich....	45
Tab. 11:	DUhTP vs DUC_sed, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte ($p < 0,05$).	47
Tab. 12:	DUhTP vs DUC_TM, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte ($p < 0,05$)	48
Tab. 13:	DUhTP_TM vs sed, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte ($p < 0,05$)	49
Tab. 14:	DUC_TM vs sed, Top 10 der differentiell exprimierten RNA-Transkripte ($p < 0,05$)....	50
Tab. 15:	Vergleich der Expression mit Muskeldifferenzierung und IGF1-Akt-Signalweg assoziierter Gene	62
Tab. 16:	Expressionsunterschiede von Gentranskripten, die für Proteine der Atmungskette kodieren.....	67
Tab. 17:	Vergleich der Expression von Komponenten des mitochondrialen Metabolismus.....	69
Tab. 18:	Vergleich der Expression von Stress-induzierten Molekülen und Komponenten der Abwehr oxidativen Stresses.....	76

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Modellhafter Skelettmuskelquerschnitt.....	2
Abb. 2:	IGF1-Akt-Signalweg.....	4
Abb. 3:	Energieliefernde Systeme nach Belastungsdauer.....	6
Abb. 4:	Selektion auf hohe Laufbandleistung in Dummerstorf	12
Abb. 5:	Studiendesign	17
Abb. 6:	Workflow der vorliegenden Arbeit	24
Abb. 7:	Ablauf des Trainingsversuches	26
Abb. 8:	Dimensionsreduktions-Darstellung des gesamten NGS-Datensatzes	42
Abb. 9:	Validierung der RNASeq-Ergebnisse mittels PCR.....	43
Abb. 10:	Venn-Diagramm der detektierten DEGs des Linienvergleiches	46
Abb. 11:	Venn-Diagramm der detektierten DEGs des Trainingsvergleiches	46
Abb. 12:	Auf RNA-Ebene im Muskel modulierte Signalwege im Vergleich von DUhTP- Marathonmäusen zu DUC-Kontrollmäusen.....	52
Abb. 13:	Auf RNA-Ebene im Muskel modulierte Signalwege in den Trainingsvergleichen	53
Abb. 14:	Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators Myod1 und seiner Verbindungen zu den (trainingsassoziierten) DEGs im Datensatz modifiziert nach IPKB	55
Abb. 15:	Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators Myod1 und seiner Verbindungen zu den im Linienvergleich differentiell exprimierten Genen im Datensatz nach IPKB.....	57
Abb. 16:	Expression des Insulin-like growth factor 1 (IGF1) -Rezeptors	58
Abb. 17:	Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von Akt	59
Abb. 18:	Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von phosphatase and tensin homolog (PTEN)	60
Abb. 19:	Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK)	61
Abb. 20:	Proteinkonzentration von zytosolischem (a) und membranösem (b) Glukosetransporter GLUT4	64
Abb. 21:	Spezifische Enzymaktivität der Laktat-Dehydrogenase.....	67
Abb. 22:	Spezifische Enzymaktivität der Kreatin-Kinase	67
Abb. 23:	Spezifische Enzymaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase.....	68
Abb. 24:	Schematische Darstellung der mit der Oxidativen Phosphorylierung/Atmungskette ermittelten DEGs im Vergleich trainierter DUhTP- und trainierter DUC-Mäuse	68

Anhang

Abb. 25:	Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators FoxO3 und seiner Verbindungen zu den (trainingsassoziierten) DEGs im Datensatz modifiziert nach IPKB.....	71
Abb. 26:	Analyse der Regulator-Effekte des Upstream-Regulators FoxO3 und seiner Verbindungen zu den im Linienvergleich differentiell exprimierten Genen i m Datensatz nach IPKB.	73
Abb. 27:	Die Gesamtexpression (a), Phosphorylierung (b) und spezifische Aktivität (c) von p38 mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK).....	74
Abb. 28:	Die Expression von NF- κ B im Muskel von DUhTP-Marathonmäusen und DUC-Kontrollmäusen mit und ohne Training	75
Abb. 29:	Schema der am IGF1-Akt-Signalweg beteiligten DEGs und ihre Expression im Vergleich zur Kontrolllinie DUC.....	84

9.3 Lebenslauf

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name	Elli Brosig
Geburtsdaten	08. Februar 1997 in Rostock
Adresse	Patriotischer Weg 71, 18057 Rostock
E-Mail	elli.brosig@uni-rostock.de

Ausbildung

04/2019-dato	Doktorarbeit zum Thema "Effekt eines Laufbandtrainings auf das Transkriptomprofil von Muskelzellen in Mäusen mit hoher Laufleistung" Universitätsmedizin Rostock und Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Rostock
10/2015-dato	Studium der Humanmedizin Universität Rostock
02/2020-03/2020	Famulatur Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde Universitätsmedizin Rostock
02/2019-03/2019	Famulatur Interdisziplinäre Notaufnahme Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
08/2018-09/2018	Famulatur Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Pneumologie Universitätsmedizin Rostock
02/2018-03/2018	Famulatur Kinderärztliche Praxis Dr. med. Brosig Hemmoor
07/2017	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Universitätsmedizin Rostock
07/2015	Abitur Privates Internatsgymnasium Schloss Torgelow
08/2012-07/2015	Privates Internatsgymnasium Schloss Torgelow Torgelow am See
08/2007-07/2012	Vincent-Lübeck-Gymnasium Stade
08/2003-07/2007	Grundschule Bockhorster Weg Stade

Kenntnisse und Interessen

Fremdsprachen	Deutsch (Muttersprache) Englisch (fließend) Latein (Latinum) Schwedisch (Grundkenntnisse) Spanisch (Grundkenntnisse)
Hobbys	Klavier spielen und Sport (Freeletics, Drachenboot und Tennis)

9.4 Supplementäre Dokumente

QIAGEN Bioinformatics Technical Support

May 14, 2020

To whom this may concern:

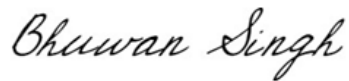
Elli Brosig has been granted permission by QIAGEN Silicon Valley to use copyrighted figures (both print and digital) generated from QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) for the publication.

Figures and data produced from IPA are available under an open-access CC-BY license for purposes of publication.

If you have any further questions, please contact QIAGEN Bioinformatics Technical Support at ts-bioinformatics@qiagen.com

Best regards,

(on behalf of QIAGEN Silicon Valley)



Bhuwan Singh

Scientist, Advanced Genomics Support

QIAGEN - Sample to Insight

Phone American: +1-866-464-3684 | Danish: +45-80 82 0167
ts-bioinformatics@qiagen.com
www.qiagenbioinformatics.com

Making improvements in life possible

9.5 Thesen zur Dissertation

- 1) Die Fähigkeit eines Organismus, eine herausragende Ausdauerleistung zu vollbringen, wird beeinflusst durch die individuelle genetische Veranlagung, Umweltfaktoren wie Ernährung sowie gezieltes Training. Der Skelettmuskel als das die Bewegung ausführende Organsystem spiegelt die Einflüsse eines Trainings einerseits und der Genetik andererseits in besonderem Maße wider.
- 2) Individuelle Unterschiede im Laufleistungsvermögen zeigen sich womöglich anhand einer unterschiedlichen Genexpression im Muskel. Es ist anzunehmen, dass die muskuläre Genexpression durch die an den Muskel gestellten Anforderungen beeinflusst wird.
- 3) Es wurde ein Mauskollektiv aus insgesamt 32 Mäusen zweier Mauslinien, *Dummerstorf high Treadmill Performance* (DUhTP)-Marathonmaus (n=16) und DUC-Kontrollmaus (n=16), betrachtet. Beide Mauslinien entstammten der gleichen Ursprungslinie. Die DUhTP-Marathonmäuse wurden seit 1982 anhand einer herausragenden Ausdauerleistung ausgewählt. Die ausdauerndsten Läufer wurden für die Zucht der nächsten Generation der DUhTP-Marathonmäuse verwendet. Die DUC-Kontrollmäuse bildeten die nicht-ausdauerselektierte Vergleichslinie.
- 4) Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des muskulären Transkriptomprofils der auf Ausdauer selektierten DUhTP-Marathonmäuse im Vergleich zu nicht ausdauerselektierten DUC-Kontrollmäusen. Es sollte so geklärt werden, welche Signatur des Muskeltranskriptoms für einen ausdauernden Muskel charakteristisch ist. Darüber hinaus wurden die transkriptionellen Veränderungen, die im Zuge eines Laufbandtrainings im Muskel erfolgen, untersucht.
- 5) Je 8 Mäuse beider Mauslinien, DUhTP-Marathonmaus und DUC-Kontrollmaus, absolvierten ein dreiwöchiges Laufbandtraining (5x/Woche á 30 min) unter submaximaler Belastung (*treadmill*; *_TM*). Die jeweils verbleibenden 8 Individuen beider Mauslinien wurden keiner weiteren Intervention unterzogen (*sedentary*; *_sed*). Es entstanden so insgesamt vier Gruppen, DUhTP-Marathonmäuse mit Training (DUhTP_*_TM*), DUhTP-Marathonmäuse ohne Training (DUhTP_*_sed*), DUC-Kontrollmäuse mit Training (DUC_*_TM*) und DUC-Kontrollmäuse ohne Training (DUC_*_sed*).
- 6) Die Oberschenkelmuskeln (M. rectus femoris) der Mäuse aller vier Gruppen wurden gewogen und die daraus isolierte RNA mittels RNASeq analysiert. Die Daten der Gruppen wurden anschließend paarweise miteinander verglichen, um differentiell exprimierte Gene (DEGs) zu identifizieren. Diese aus den Gruppenvergleichen (anhand von *Fold Changes* und Signifikanztests) erhaltenen DEGs wurden einer computergestützten Signalweganalyse

mittels *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) unterzogen. Die IPA-Analysen sowie Literaturrecherchen wurden genutzt, um relevante Gene im Zusammenhang mit den Themen Muskeldifferenzierung, mitochondrialer Metabolismus und oxidativer Stress zu identifizieren. Für eine Auswahl der in den NGS-Analysen identifizierten DEGs wurden die Expressionsunterschiede mittels qPCR überprüft. Um Aussagen auf Proteinebene treffen zu können, schlossen sich zusätzlich Western Blot- und Kapillar-Immunoblot-Analysen sowie Enzymaktivitätsmessungen an,

- 7) Die vorliegende Arbeit zeigt, dass DUhTP-Marathonmäuse eine im Mittel signifikant geringere (etwa -25 %) Oberschenkelmasse als DUC-Kontrollmäuse sowohl mit als auch ohne Laufbandtraining aufwiesen ($p < 0,05$), wobei bei beiden Mauslinien das Laufbandtraining mit einer nicht-signifikant geringeren (etwa -7-8 %) durchschnittlichen Muskelmasse einherging. Damit assoziiert war eine im Vergleich zu DUC-Kontrollmäusen geringere Expression von Genen der wachstumsfördernden *Insulin-like growth factor 1* (IGF1)-Akt-Achse in DUhTP-Marathonmäusen.
- 8) Im Vergleich der DUhTP-Marathonmaus und DUC-Kontrollmäuse zeigten sich numerisch mehr Unterschiede auf Transkriptomebene ($n=7775$ DEGs [DUhTP_TM vs DUC_TM], $n=6857$ DEGs [DUhTP_sed vs DUC_sed]) als innerhalb einer Linie im Vergleich der trainierten mit untrainierten Individuen ($n=3507$ DEGs [DUhTP_TM vs sed]; $n=1491$ DEGs [DUC_TM vs sed]).
- 9) Eine in den DUhTP-Marathonmäusen vermehrte muskuläre Expression von Genen, die eine Rolle für den mitochondrialen Metabolismus spielen, deutet auf eine optimierte Energieversorgung des Muskels hin. Dazu gehörte eine gegenüber den DUC-Kontrollmäusen signifikant vermehrte Expression von Genen der β -Oxidation (Acyl-CoA-Dehydrogenase [*Acadl*, *Acadvl*], Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase [*Hadh*]) ($p < 0,05$) und des Citratzyklus (Citrat-Synthase [*Cs*], α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex [*Dld*, *Dlst*, *Ogdh*], Isocitrat-Dehydrogenase [*Idh3b*, *Idh3g*]) ($p < 0,05$). Im Vergleich zu trainierten DUC-Kontrollmäusen zeigte die Mehrheit aller gemessenen Gene der Atmungskette eine erhöhte Expression in trainierten DUhTP-Marathonmäusen (Komplex I: 65,0 %; Komplex II: 60,0 %; Komplex III: 71,4 %; Komplex IV und ATP-Synthase: 76,9 %) als Ausdruck für eine verbesserte muskuläre Energieversorgung.
- 10) Verglichen mit DUC-Kontrollmäusen wurden in DUhTP-Marathonmäusen mit dem Glukosestoffwechsel assoziierte Gene (Glukosetransporter 4 [*Slc2a4*], Pyruvat-Kinase [*Pkm*], Pyruvat-Dehydrogenase [*Pdhb*]) und Gene mitochondrialer Shuttlesysteme (Malat-Aspartat-Shuttle [*Mdh1*, *Mdh2*], α -Glycerophosphat-Shuttle [*Gpd1*]) vermehrt exprimiert. Enzymaktivitätsmessungen im Muskel ergaben im Vergleich zu trainierten DUC-

Kontrollmäusen in DUhTP-Marathonmäusen im Mittel eine 1,2-fach geringere Aktivität der Laktat-Dehydrogenase bei zugleich etwa 1,5-fach erhöhter Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität ($p < 0,05$).

- 11) In den DUhTP-Marathonmäusen wurde eine verminderte Expression der reaktive Sauerstoffspezies-produzierenden Enzyme NADPH-Oxidase und Phospholipase A2 bei zugleich erhöhter Expression von Genen des antioxidativ wirkenden Glutathionsystems (*Gpx1-3*) sowie von Superoxiddismutasen festgestellt ($p < 0,05$). Verglichen mit untrainierten DUC-Kontrollmäusen wies das Hitzeschockprotein 70 als Indikator für erhöhten zellulären Stress eine im Mittel deutlich verminderte Expression in untrainierten DUhTP-Marathonmäusen auf (*Hspa1a*: $\log_2FC = -2,4$; *Hspa1b*: $\log_2FC = -3,6$).
- 12) Trainingsbedingte transkriptionelle Anpassungsvorgänge erfolgten vorwiegend in Form einer Stimulation muskulärer Reparaturmechanismen. Damit assoziiert war eine im Vergleich DUC_TM vs sed vermehrte Expression der Myogenese regulierenden Faktoren Myogenin und Myogener Faktor 3 sowie des Proteins Myomaker in der Trainingsgruppe ($\log_2FC > 1$; $p < 0,05$).
- 13) In weiteren Untersuchungen sollten die Ergebnisse der vorliegend überwiegend auf Transkriptomebene erfolgten Untersuchungen auch auf Proteinebene weiter ergänzt werden. Dabei könnte das Augenmerk insbesondere auf die DEGs in Zusammenhang mit Muskeldifferenzierung, mitochondrialem Metabolismus und oxidativem Stress gelegt werden. Zusätzlich könnten histologische und immunhistochemische Untersuchungen des Muskelgewebes angeschlossen werden, um den vorherrschenden Muskelfasertyp sowie die Satellitenzellaktivität als Indikator für eine stimulierte Muskelregeneration zu bestimmen.
- 14) Die Fortführung der Untersuchungen am DUhTP-Marathonmausmodell eröffnet für die Humanmedizin und hier insbesondere für den Bereich der medizinischen Gentherapie neue Chancen: Ein Gen oder Kombinationen von Genen zu finden, die mit einer verbesserten Ausdauer und einem erhöhtem muskulären Regenerationspotential assoziiert sind, kann in Zukunft womöglich auch bei der Prävention alters- oder immobilisationsbedingten Muskelabbaus angewendet werden. Zusätzlich kann das Mausmodell dafür genutzt werden, zu untersuchen, welche weiteren Faktoren (neben Selektion und Training) die Genexpression beeinflussen. Vorstellbar diesbezüglich wäre, beispielsweise definierte Nahrungs- oder pharmakologische Interventionen anzuschließen, um damit assoziierte positive und negative Auswirkungen auf das Muskeltranskriptom und die muskuläre Leistungsfähigkeit darzustellen. So können perspektivisch für den Bereich der Sport- oder Rehabilitationsmedizin die Ausdauer und muskuläre Regenerationsfähigkeit steigernde Nahrungsmittel oder Pharmazeutika entdeckt werden.

Anhang

9.6 Eidesstattliche Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, Elli Brosig, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Wörtliche oder inhaltliche Zitate anderer Werke sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Ich versichere, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

.....

Datum, Ort

.....

Elli Brosig

9.7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir das Vollenden dieser Arbeit ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gebührt:

Herrn Prof. Dr. med. U. K. Zettl, Sektionsleiter der Sektion für Neuroimmunologie in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock, für die Bereitstellung des spannenden Themas und für die Durchsicht meiner Ausführungen.

Herrn PD Dr. rer. nat. A. Höflich für die Betreuung und Durchsicht meiner Ausführungen und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Forschungslabor des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie in Dummerstorf, Abteilung Signaltransduktion, durchführen zu können.

Frau Dr. rer. nat. J. Brenmoehl für ihre bemerkenswerte Geduld und unerschöpfliche Ausdauer, wenn es um die Durchsicht meiner Ausführungen ging. Ohne ihre Unterstützung, die zahlreichen Rückmeldungen und die stete Hilfsbereitschaft hätte ich diese Arbeit niemals in dieser Zeit geschafft.

Frau Dr. rer. nat. C. Walz dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, mir bei der Durchführung der IPA-Analysen zur Seite stand und darüber hinaus auch noch Zeit für die Durchsicht meiner Ausführungen fand.

Frau Dr. rer. nat. D. Ohde für ihre Unterstützung in der RNA-Sequenzierung und die ebenfalls unermüdliche Geduld, meine Ausführungen durchzusehen.

Herrn Dipl.-Phys. M. Walz für die Unterstützung bei den Kapillar-Immunoblot-Analysen sowie für die inspirierenden Gespräche außerhalb des Labors.

Frau H. L. D. Chau für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Western Blot-Analysen und der RNA-Extraktion sowie für weitere Hilfestellungen im Labor.

Allen Mitarbeitern des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf, Abteilung Signaltransduktion sowie den Mitarbeitern des Institutes für Muskelbiologie und Wachstum, die die Muskelproben sowie die muskulären Enzymaktivitätsmessungen bereitstellten.

Herrn Dr. N. Trakooljul, der die NGS-Analysen durchführte, die erste bioinformatische Prozessierung vornahm und die prozessierten Daten für die in der Arbeit dargestellten weiteren Analysen zur Verfügung stellte.

Herrn Dr. rer. nat. M. Hecker für seine sehr konstruktive Kritik, seine Gewissenhaftigkeit bei der Durchsicht meiner Arbeit und die Bereitstellung zusätzlicher Informationen zu meinem Thema.

Anhang

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen beiden Brüdern bedanken, die mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückholten. Ohne euren Rückhalt, eure kritischen Kommentare und aufmunternden Worte wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Zu guter Letzt gilt mein Dank noch den eigentlichen Helden dieser Arbeit: den Mäusen des Dummerstorf-Mausmodells, ohne die diese Arbeit nie verfasst worden wäre.