

---

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin  
der Deutschen Sporthochschule Köln  
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

Bedeutung von Palladin für die trainingsinduzierte Anpassung der  
Skelettmuskulatur

von der Deutschen Sporthochschule Köln zur  
Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Sportwissenschaft  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Pil-Sang Kim**  
aus  
Seoul/ Süd-korea

Köln 2012

---

---

Erster Referent:	Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Bloch
Zweiter Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Klara Brixius
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Bloch
Tag der Disputation:	24. 10. 2012

#### Erklärung

Hierdurch versichere ich an Eides Statt: Ich habe diese Dissertationsarbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebene Quellen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitat kenntlich gemacht worden.

Köln, den 28. Feb. 2012

---

Pil-Sang Kim

---

---

## **Danksagung**

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilhelm Bloch für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, jahrelange geduldige Betreuung und freundliche Motivation, vor allem für viele nützliche Ratschläge und die Geduld bei der Beantwortung meiner vielen Fragen

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Klara Brixius für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Bianca Collins, Anika Voß und Mojgan Ghilav sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die herzliche Arbeitsatmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zudem möchte ich meinen Eltern herzlich für ihre finanzielle Unterstützung und Anteilnahme an meinem Promotionsstudium in Deutschland danken.

Meiner Frau Min-Jung Kim gilt mein besonderer und herzlicher Dank. Sie hat mir moralisch immer unterstützt den Rücken gestärkt, ohne diese Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

---

Für meine Familie

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Fokale Adhäsion.....	1
1.1.2 Fokale Adhäsionsmoleküle.....	2
1.2 Palladin.....	4
1.3 Muskulatur.....	6
1.3.1 Trainingsbedingte Muskeladaptation.....	6
1.3.2 Hypertrophie.....	7
1.3.3 Kapillarisierung.....	8
1.3.4 Muskelfasertypen.....	9
1.4 Signaltransduktionswege.....	10
1.4.1 Caspase.....	10
1.4.2 AKT Signalweg.....	11
1.4.3 ERK Signalweg.....	12
1.5 Ziel der Arbeit.....	15
<b>2. Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Versuchstiere.....	16
2.1.1 Aufbau des Trainings.....	17
2.1.2 Präparation.....	17
2.2 Kryostatschnitte.....	18

---

2.3 Semidünnschnitte.....	19
2.4 Färbemethoden.....	20
2.4.1 Methylenblaufärbung.....	20
2.4.2 Analyse der mit Methylenblau gefärbten Schnitte.....	20
2.4.2.1 Faserdurchmesserbestimmung.....	20
2.4.2.2 Zellkernzählung und –lokalisierung.....	21
2.4.2.3 Kapillarisierung.....	22
2.4.3 Succinatdehydrogenasefärbung.....	22
2.4.3.1 Auswertung SDH-Färbung.....	23
2.4.4 Immunhistochemie.....	24
2.4.4.1 Auswertung der Immunhistochemie.....	29
2.5 Statistik.....	30
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1 Muskelfaserdurchmesser.....	31
3.2 Zellkernlokalisierung.....	35
3.3 Kapillarisierung.....	40
3.4 Muskeltypisierung.....	43
3.5 Aktivierung von Caspase-3.....	53
3.6 Aktivierung von p-Akt(Thr308).....	59
3.7 Aktivierung von p-Akt(Ser474).....	65
3.8 Aktivierung von p-ERK.....	71

---

---

<b>4.Diskussion</b> .....	<b>75</b>
4.1 Einfluss der Palladin-Defizienz auf die Veränderung der Muskelzellgröße unter Trainingsbelastung.....	75
4.2 Einfluss der Palladin-Defizienz auf die Veränderung der Zellkernzahl im Skelettmuskel durch körperliches Training.....	77
4.3 Einfluss der Palladin-Defizienz auf die Veränderung der Kapillarisation im Skelettmuskel durch körperliches Training.....	79
4.4 Verschiebung der Muskelfasertypen bei Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung...	81
4.5 Die Auswirkung der Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung auf die Aktivierung von Caspase-3 im Skelettmuskel.....	84
4.6 Die Auswirkung der Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung auf die Aktivierung von p-Akt im Skelettmuskel.....	85
4.7 Die Auswirkung der Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung auf die Aktivierung von p-ERK im Skelettmuskel.....	88
<b>5.Zusammenfassung</b> .....	<b>91</b>
<b>6.Literaturverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>130</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	130
7.2 Tabellenverzeichnis.....	132
7.3 Abstract.....	134
7.4 Lebenslauf.....	136

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Rinderserumalbumin
CAS	Crk-associated substrate
Caspase	Cysteine-aspartic proteases
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECM	Extracellular matrix
eIF-2B	Eukaryotic initiation factor-2B
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FA	Focal adhesion
FAK	Focal adhesion kinase
FAC	Focal adhesion complex
FGF	Fibroblast growth factor
FOXO	Forkhead box protein
GSK3 $\beta$	Glycogensynthase-Kinase-3 $\beta$
HCL	Salzsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat shock protein
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
ILK	Integrin-linked kinase
IHC	Immunhistochemie

---

JNK	Jim NH2-terminal kinase
KO	Knockout
LASP-I	LIM and SH3 domain protein 1limb
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Myosin heavy chain
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
PBS	phosphate buffered saline
PDK 1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ co-activator 1 $\alpha$
PI(3)K	Phosphoinositide 3-kinase
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PR	Prolinreiche Region
SDH	Succinate dehydrogenase
Tab	Tabelle
TBS	tris buffered saline
TGF-1 $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vo <sub>2max</sub>	maximale Sauerstoffaufnahme
WT	wild type

---

## 1. Einleitung

Extrazelluläre Matrix (ECM) ist nicht nur für die strukturelle und funktionelle Organisation der Zelle durch Signalprozesse, sondern auch für die mechanische Stabilität des Gewebes verantwortlich.

Die Interaktionen zwischen der ECM und der Zelle sind entscheidend für das Überleben der Zelle und für normale zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Wachstum und Migration. Die physische Bindung zwischen den Adhäsionsrezeptoren, wie den Integrinen, und dem Aktinzytoskelett gewährleistet die bidirektionale Kraftübertragung und übermittelt biochemische Signale über die Plasmamembran (Calderwood et al., 2000; Calderwood & Ginsberg, 2003; Blystone, 2004).

Damit das Genexpressionsmuster der Zelle transformiert werden kann, ist es notwendig, dass extrazelluläre Informationen von den Zelloberflächenrezeptoren erfasst, in die Zelle weitergeleitet und in eine intrazelluläre Antwort translatiert werden. Dieser Prozess wird als Signaltransduktion bezeichnet und enthält ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden (Cooper, 1995; Schmidt, 2004). Durch Interaktion mit dem Zytoskelett, den Signalmolekülen und anderen zellulären Proteinen übertragen zytoplasmische Domänen der Integrine das „outside-in Signal“ der Zelle und regulieren die Integrin-medierte Funktionen (Liu et al., 2000).

### 1.1 Fokale Adhäsion

Um die ECM oder andere Zellen ziehen zu können, ist es nötig, dass eine Stressfaser (Aktinfilamentbündel) an der richtigen Stelle einer Plasmamembran fest verankert ist (Bruce et al., 1995; Burridge & Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Zudem bedarf es einer Zelladhäsion der einzelnen Zellen aneinander und an den Bestandteilen der ECM, damit überhaupt mehrzellige Organismen existieren können.

Adhäsionen, bei denen Zellen auf der intrazellulären Seite mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind, werden als Fokalkontakte oder fokale Adhäsionen bezeichnet (Zaidel-Bar et al. 2004).

Fokale Adhäsionen sind erst durch die Elektronenmikroskopie von Abercrombie et al. (1971) als elektronendichte Regionen der Plasmamembrane identifiziert worden, die innige Verbindung mit dem Substrat herstellen (Lo, 2006).

Die wichtigsten Transmembran-Verbindungsproteine der fokalen Kontakte gehören zur Familie der Integrine, die sich jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen. Zudem spielen die Integrine eine zentrale Rolle bei der zellulären Adhäsion und der Verbindung mit dem Zytoskelett und sind an der Erzeugung der intrazellulären Signale mit Tyrosinphosphorylierung beteiligt (Schaller et al., 1993.)

Vor allem sind die fokalen Adhäsionen ein Hauptort der Signaltransduktion, die das Wachstum der Zelle steuert, und bilden eine strukturelle Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und der extrazellulären Matrix (Burrige, 2005).

Die Signaltransduktion durch fokale Adhäsionen ist bei der Regulation zellulärer Prozesse wie Migration, Überleben, Proliferation oder Differenzierung festgestellt worden (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Schwartz et al., 1992). Im Bereich der fokalen Adhäsionen finden sich verschiedene Proteine wie FAK, Talin, Vinculin, Tensin, p130 cas, Paxillin usw., die an der Integrin-vermittelten Signaltransduktion der Zelle beteiligt sind.

### **1.1.2 Fokale Adhäsionsmoleküle**

Es gibt mehr als 50 verschiedene fokale Adhäsionsmoleküle, die vor 2001 identifiziert wurden (Zamir & Geiger, 2001); ihre Liste wächst seither ständig weiter. Diese Moleküle werden gemäß ihrer Lokalisation in drei Gruppen unterteilt: extrazellulär, transmembranär, zytoplasmatisch. Bekanntlich bestehen mehrere Mitglieder der fokalen Adhäsionsmoleküle, einschließlich  $\beta$ 1-Integrin, ILK, FAK, Paxillin, Zyxin, Talin/Vinculin, Tensin, Vinexin,  $\alpha$ -Actinin, PINCH, Profilin, PTP1B, Rho und ERM-Familie (Lo, 2006).

Diese Proteine enthalten mehrfache Domänen, durch die sie mit andersartigen molekularen Partnern interagieren können und gestalten ein dichtes und heterogenes Protein-Netzwerk an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran (Zamir & Geiger, 2001).

Darunter finden sich fokale Adhäsionsproteine wie die FAK (focal adhesion kinase), Cas (crk-associated substrate) und Paxillin, die als Adapterproteine an der Koordination der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

FAK gehört zur Gruppe der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, die eine essenzielle Rolle während der embryonalen Entwicklung übernehmen (Schaller. 2010). Vor allem kann sie durch verschiedene Stimuli aus der extrazellulären Matrix aktiviert werden und reguliert zelluläre Prozesse wie die Proliferation und die Migration der Zellen (Mitra et al., 2005; Schaller. 2010). Weiterhin sind vermutlich Adapterproteine wie Paxillin, p130Cas (Kostic & Sheetz, 2006; Zaidel-bar et al., 2005) und Zysin (Zaidel-bar et al., 2003; Yoshigi et al., 2005; Lele et al., 2006) an der zellulären Reaktion auf mechanischen Stress beteiligt (Bershadsky et al., 2006). Paxillin wird als ein 68-kDa Zytoskelettprotein zu FAC (focal adhesion complex) rekrutiert, wenn Integrine sich aufgrund der Besetzung von deren Rezeptoren zusammenlagern (Hildebrand et al., 1995; Flück et al., 1999).

Weitere Proteine wie Vinculin, Talin und  $\alpha$ -Aktinin dienen einer strukturellen Verbindung zwischen Integrinen und F-Aktin (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

Vinculin und Talin sind Zytoskelettproteine, die für eine essenzielle Komponente der Verankerung des Aktinzytoskeletts an der Innenseite der Plasmamembran gehalten werden. (Schwartz 1992; Anastasi et al., 2009). Neben der Rolle bei der Verbindung mit Aktinzytoskelett ist auch das Talin an der Aktivierung der Integrine beteiligt (Tadokoro et al., 2003).  $\alpha$ -Aktinin ist eine in hohem Maße konservierte Familie der Aktin-verbindenden Proteine (Clarkson et al., 2005), die eine Rolle bei der Regulation der zytoskelettalen Organisation und Muskelkontraktion spielen (MacArthur & North, 2004). Vor allem gehört es zur Superfamilie des Spektrinproteins, die Spektrine und Dystrophine beinhaltet (Blanchard et al., 1989). Des Weiteren ist das  $\alpha$ -Aktinin an zwei Hauptproteinkomplexen beteiligt, die die Sarkomere durch Interaktion mit dem Dystrophin (Hance et al, 1999) und dem Integrin an die Muskelfasermembran (Otey et al, 1990) binden (MacArthur & North, 2004).

## 1. 2 Palladin

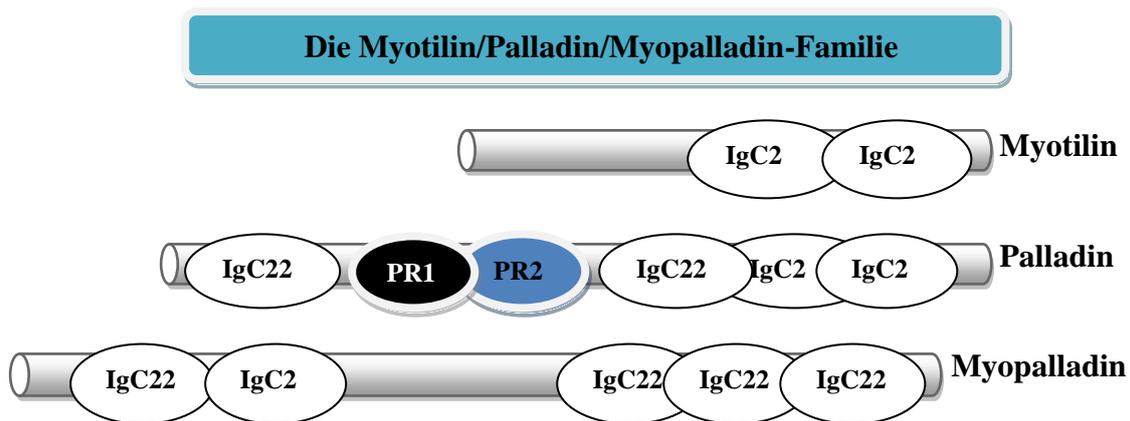
Palladin ist ein Phosphorprotein, das eine wichtige Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletons spielt und an der Zellmotilität und -adhäsion in Bezug auf Stressfaser, fokale Adhäsion, Zellbindung, Zellwachstum und Z-Scheibe beteiligt ist (Goicoechea et al., 2006). Zudem ist Palladin an der Gewebeumgestaltung beteiligt, die in Reaktion auf eine Beschädigung des Gewebes erfolgt (Boukhelifa et al., 2003). Das Palladin wurde nach dem Renaissance-Architekten Andrea Palladio benannt, um seine Beteiligung an architektonischen Elementen der Zelle widerzuspiegeln (Parast & Otey, 2000).

Bekanntermaßen gehört Palladin zur Familie der Proteine Palladin, Myotilin und Myopalladin, die durch konservierte Domänen der Igl-Type im C-terminalen Anteil des Proteins gekennzeichnet ist (Parast & Otey 2000; Mykkänen et al., 2001; Salmikangas et al., 1999; Bang et al., 2001). Darunter sind Myotilin und Myopalladin an der Aufrechterhaltung der Integrität der Sarkomere beteiligt (Rönty et al., 2005).

Hauptsächlich werden Myotilin und Myopalladin im gestreiften Muskel exprimiert, während das Palladin weitgehend in den mesenchymalen Zellen und Epithelzellen exprimiert wird (Otey & Carpen, 2004; Mykkänen et al., 2001).

Darüber hinaus existiert das Palladin in vielfachen Isoformen, deren Transkription in der Zelle, bezogen auf den spezifischen Zelltyp, reguliert wird. Die genomischen Strukturen des Palladin der Mäuse beziehen die Präsenz dreier verschiedener Promotorregionen mit ein, die die spezifische Gewebeexpression der unterschiedlichen Isoformen ermöglichen können (Rachlin & Otey, 2006; Rönty et al., 2006). Ferner besteht das Palladin-Gen der Mäuse aus mindestens 25 Exonen und führt zu 4 Proteinisoformen mit 200 kDa, 140kDa, 90-92 kDa und 50 kDa (Rachlin & Otey, 2006; Wang & Moser, 2008).

Insbesondere enthält das Palladin drei Tandeme der Ig-C2-Domänen. Im Gegensatz zu den intrazellulären Ig-C2-haltigen Proteinen, die spezifisch für den Skelettmuskel sind, ist das Palladin in den Geweben und Zellen von Muskel und Nichtmuskel vorhanden (Parast & Otey, 2000). Das Palladin bildet eine neuartige Unterfamilie der zytoskeletalen Ig-C2-haltigen Proteine mit Myotilin und Myopalladin (Salmikangas et al., 1999; Parast & Otey, 2000; Bang et al., 2001; Mykkänen et al., 2001).



**IgC2: Immunglobulin-ähnliche Domäne des Typs C2**

**PR: Prolinreiche Region**

Abb.1: Schematische Darstellung der Proteine der Myotilin/Palladin/Myopalladin Familie (eigene Darstellung, modifiziert nach Goicoechea et al., 2002).

Neben den Ig-Domänen spielen die zwei PR(Prolinreiche Region)-Domänen des Palladins eine wichtige Rolle bei seinen molekularen Bindungsinteraktionen (Grunewald & Butt, 2008). Ein Cluster von prolinreichen und serinreichen Regionen ist in der Mitte des Proteins vorhanden. Darunter werden die zwei prolinreichen Regionen als PR1 und PR2 bezeichnet (Rachlin & Otey, 2006).

Die prolinreiche Region 1-Domäne des Palladins bindet sich mit Lasp-1 (LIM and SH3 domain protein 1) (Grunewald & Butt, 2008), das als ein Aktin-bindendes Protein für die Motilität der Zelle erforderlich ist (Rachlin & Otey., 2006; Grunewald et al., 2008).

Die drei Isoformen des Palladin-Proteins teilen sich eine gemeinsame PR2-Domäne, die eine Bindungsstelle für VASP(Vasodilator-stimulated phosphoprotein)-Familienmitglieder ist. Die 140- und die 200-kDA-Isoformen des Palladins besitzen zwei zusätzliche VASP-Bindungsstellen in ihrer PR1-Domäne (Boukhelifa et al., 2004; Rachlin & Otey, 2006). Die PR2- Domäne des Palladin bindet Profilin (actin-regulatin protein) (Boukhelifa et al., 2006), Eps8 (Goicoechea et al., 2006), Src (Rönty et al., 2007) und Signalvermittler wie ArgBp-2 und SPIN-90 (Rönty et al. 2005, Rönty et al. 2007).

### **1.3 Muskulatur**

Der Skelettmuskel ist ein hoch plastisches Gewebe, das über eine morphologische und metabolische Adaptation an die körperliche Aktivität verfügt (Hood et al., 2006).

#### **1.3.1 Trainingsbedingte Muskeladaptation**

Beispiele für trainingsinduzierte Veränderungen in der Skelettmuskulatur sind erhöhte Kapillardichte, Proteinexpression der wichtigsten Gene für die Stoffwechselkontrolle, erhöhte Transportprozesse der Membran und eine verbesserte Sensibilität für Hormone wie Insulin (Widegren et al., 2001).

Im Allgemeinen führt ein Krafttraining zu einer morphologischen Adaptation, die als Muskelhypertrophie angesehen werden kann (Hansen et al., 2001). Diese morphologische Veränderung des Skelettmuskels unter Trainingsbelastung geht vor allem mit einer Kraftzunahme einher, wobei die Erhöhung der Muskelkraft durch neuromuskuläre Anpassungen bezüglich einer Verbesserung der intramuskulären Koordination erzielt werden kann. Neben einer Muskelhypertrophie konnte auch eine Verbesserung der Kraftausdauer und anaeroben Kapazität durch Krafttraining nachgewiesen werden (Costill et al., 1979; Stone et al., 1991; Braith et al., 1993).

Jedoch bewirkt ein Ausdauertraining metabolische und strukturelle Adaptationen im Skelettmuskel, die mit einer Vermehrung des Mitochondriengehalts und Erhöhung der Kapillarisation einhergehen (Hoppeler et al., 1985). Beim Tiermodell konnte auch beobachtet werden, dass die oxidative Kapazität im Skelettmuskel nach Ausdauertraining zunimmt (Davies et al., 1981; Dudley et al., 1982; Houle-Leroy et al., 2000). Vor allem erhöht sich die oxidative Kapazität im Muskel durch eine Zunahme der Mitochondriendichte (Holloszy & Coyle, 1984). Zudem ist bekannt, dass das Ausdauertraining eine Verschiebung der schnellen Muskelfasern zu einem langsamen Phänotyp bewirkt (Sullivan et al. 1995; Bigard et al. 2000; Gallo et al. 2008). Die individuelle Reaktion auf körperliches Training im Skelettmuskel wird vor allem sowohl durch genetische Faktoren als auch durch weitere Faktoren wie Geschlecht, Alter und Ernährung beeinflusst (Bouchard et al., 1999). Dabei spielt die Art des Trainings eine entscheidende Rolle bei den trainingsinduzierten Veränderungen der Skelettmuskulatur.

Bisher wurden mehrere Trainingsprotokolle entwickelt, um verschiedene Aspekte des neuromuskulären Systems zu verbessern, wie z. B. Maximalkraft, muskuläre Hypertrophie und Kraftausdauer. Diese Protokolle unterscheiden sich in der Konfiguration trainingsintensiver Variablen, wie z. B. in Intensität, Gesamtanstrengung und Pausenintervall (Fleck & Kraemer, 1997). In zahlreichen Studien zeigten sich unterschiedliche hormonelle Reaktionen auf diese Trainingsprotokolle, die zur Muskelhypertrophie führen (Kraemer et al., 1992; Häkkinen & Pakarinen., 1993; Raastad et al., 2000; Kostka et al., 2003).

Zudem beeinflusst die Anzahl der Sätze in einer Trainingseinheit die Veränderung der Muskelhypertrophie zwischen den verschiedenen Trainingsprotokollen, wobei die Intensität, die Wiederholungen und die Pausenintervalle innerhalb jedes einzelnen Protokolls verantwortlich sind. (Smilios et al., 2003; Kim, 2004). Gewöhnlich wird eine intensive muskuläre Betätigung mit geringer Dauer mit Muskelhypertrophie in Zusammenhang gebracht, wohingegen eine moderat intensive körperliche Aktivität mit langer Trainingsdauer eine erhöhte oxidative Kapazität und eine mitochondriale Masse bewirkt (Baar, 2006; Coffey & Hawley, 2007).

### **1.3.2 Hypertrophie**

Muskelhypertrophie stellt die Vergrößerung des Muskelquerschnitts durch Dickenwachstum der Muskelfasern als Folge der Zunahme der Zahl und des Querschnitts der Myofibrillen dar (Weineck, 2002).

Für ihre Entwicklung ist die Vermehrung der kontraktilen und nicht kontraktilen Proteine erforderlich (Friedmann, 2007). Die Entstehung der Hypertrophie geht im adulten Skelettmuskel mit erhöhter Expression des IGF-I (Insulin-like growth factors I) einher (DeVol et al., 1990; Goldspink et al., 1983;). Vor allem wird die Hypertrophie des Skelettmuskels durch IGF-1 mit der Vermehrung der Kernzahl (Musarò et al. 2001) angeregt (Suetta et al., 2010). Der Ablauf der Muskelhypertrophie scheint die Hinzufügung des Muskelkerns zur bestehenden Muskelfaser einzubeziehen (Schiaffino et al., 1976; Schiaffino et al., 1972; Salleo et al., 1983; Snow, 1990; Adams et al., 2002). Weiterhin führt die Aktivierung und Proliferation der Satellitenzellen zu einem Anstieg der Muskelkernzahl in hypertrophierten Muskelfasern (Kadi et al, 1999).

Die Skelettmuskeln der Säugetiere sind ein hoch plastisches Gewebe, das sich den Veränderungen durch den Belastungsreiz anpasst. Zudem löst die Steigerung der Muskelbelastung eine Adaptation aus, die zu einer Vergrößerung des Muskels und einer Veränderung der Kontraktionsfähigkeit führt.

Generell ist bekannt, dass die Trainingsintensität ein wichtiger Faktor für die Hypertrophie und den Kraftzuwachs des Skelettmuskels ist (Abe et al., 2006).

Eine Studie von McDonagh & Davies aus dem Jahre 1984 ergab, dass Krafttraining mit einer übermäßigen Intensität von 65 % des 1RM (one repetition maximum) für die Steigerung der Muskelgröße und der Kraft erforderlich ist.

Andererseits führt eine Betätigung mit sehr geringer Intensität und großem Volumen zu einer Verbesserung der oxidativen Kapazität des Muskels, verändert aber kaum die Muskelgröße (Holloszy & Booth, 1976; Kawada & Ishii et al, 2005). Neben der Trainingsintensität wirkt sich auch eine Änderung der Trainingsform auf die Adaptation der Muskelhypertrophie aus.

Bei einem Trainingsprotokoll mit kurzer Dauer und hoher Intensität konnte eine Skelettmuskelhypertrophie beobachtet werden (Baar, 2006), während ein Intervalltraining mit hoher Intensität, basierend auf dem Wechsel von Belastungs- und Erholungsphasen, keine Muskelfaserhypertrophie bewirken kann (Ross & Leveritt 2001).

### **1.3.3 Kapillarisation**

Bekanntermaßen weisen die Blutgefäße des Skelettmuskels ein hohes Maß an Plastizität auf (Holloszy, 1976; Holloszy & Coyle, 1984). Der Aufbau eines vaskulären Netzwerks im Skelettmuskel führt zu Kapillarwachstum (Risau, 1997). Hauptsächlich fungiert das Kapillarnetz im Skelettmuskel als Sauerstoffversorger (Hudlická, 1985). Weiterhin bilden die Kapillaren einen wesentlichen Teil des Gefäßsystems für den Stoffaustausch in den Geweben.

Die Erhöhung der Durchblutung im Skelettmuskel beim Training gilt als eine wesentliche Adaptation an das körperliche Training (Laughlin et al., 2006).

Die Kapazität der Durchblutung im Skelettmuskel wird durch körperliches Training aufgrund einer Gefäßneubildung und geänderter Gefäßplastizität erhöht (Laughlin & Roseguini., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass ein trainierter Muskel eine hohe Kapillanzahl aufweist (Nelissen-Vrancken et al., 1993).

Zudem konnte in zahlreichen Studien festgestellt werden, dass körperliches Training die kardiovaskuläre Funktion verbessert und die vaskuläre Transportkapazität des Skelettmuskels steigert (Bevegard & Shepherd, 1966; Clausen & Trap-Jensen, 1970; Rowell, 1993; Laughlin et al., 1996). Die erhöhte Kapillarisation wird vor allem durch mechanische und metabolische Stimuli ausgelöst, die die Freisetzung diffusionsfähiger Faktoren als angiogene Wachstumsfaktoren steuern (Folkman & Shin, 1992; Hudlicka et al. 1992). Darüber hinaus ist VEGF (vascular endothelial growth factor) ein wesentlicher Regulator der Angiogenese im Skelettmuskel (Amaral et al. 2001; Wagner et al. 2001; Tang et al. 2004). Eine erhöhte Expression des VEGF-Proteins liefert einen entscheidenden Anreiz für die Angiogenese (Lloyd et al., 2003), die auf die Neubildung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen hindeutet (Folkman 1986; Chavakis & Dimmeler 2002; Prior et al, 2004).

### **1.3.4 Muskelfasertypen**

Die physiologische Eigenschaft eines Muskels reflektiert die spezifischen Typen und die Konzentration der Proteine innerhalb der Muskelfaser, z.B. die Präsenz der langsamen und schnellen Myosinisoformen, die Konzentration der mitochondrialen Proteine usw. (Edgerton & Roy, 1991). Die Krafteigenschaften eines Muskels werden nicht nur durch seinen Querschnitt, sondern auch durch die Zusammensetzung der Myosinschwerketten seiner Fasern bestimmt. Da sowohl für die meisten strukturellen Proteine der Myofibrillen als auch für die Enzyme des Muskelenergiestoffwechsels verschiedene Isoformen existieren, setzt sich der Skelettmuskel aus einer Vielzahl verschiedener Muskelfasertypen zusammen (Friedmann, 2007).

Generell besteht der Skelettmuskel von Säugetieren aus heterogenen Fasertypen, die vor allem auf der unterschiedlichen Expression der MHC-Isoformen basieren (Gunning & Hardeman, 1991; Pette & Staron, 1997). Zudem hängt die kontraktile Beschaffenheit eines Muskels vom jeweiligen Anteil der Fasertypen ab (Nakatani et al. 1999).

Bekanntlich sind Typ I-Fasern reich an Mitochondrien, benutzen hauptsächlich den oxidativen Metabolismus für die Energieerzeugung, was eine stabile und dauerhafte Versorgung des ATPs sicherstellt: folglich sind diese Fasern ermüdungsresistent.

Im Gegensatz dazu enthalten Fasern des Typs II die drei Isoformen IIa, IIx und IIb. Des Weiteren haben Typ IIb-Fasern das niedrigste Niveau an mitochondrialem Inhalt und an oxidativen Enzymen, ihre Hauptenergiequelle beruht auf glykolytischem Metabolismus; ferner sind sie empfindlich für Ermüdung (Berchtold et al., 2000; Olson & Williams, 2000).

Da die Muskelfasern über ein hohes adaptives Potential verfügen, kann sich die Verteilung der Muskelfasertypen infolge regelmäßiger Trainingsbelastung verändern (Pette, 1999; Friedmann, 2007).

## **1.4 Signaltransduktionswege**

### **1.4.1 Caspase**

Die als programmierter Zelltod bezeichnete Apoptose ist ein biologischer Prozess, der durch spezifische Gene reguliert wird (Steller, 1995; Yuan, 1995; Danial & Korsmeyer, 2004). Die Notwendigkeit der Apoptose in multizellulären Organismen ist weithin anerkannt, da dieser Prozess die Eliminierung von unfunktionellen, anormalen und beschädigten Zellen ermöglicht (Thompson, 1995; Siu et al., 2004).

Im Skelettmuskel trägt die Apoptose zur Muskelfaseratrophie bei Dystrophindefizienter Myopathie bei (Sandri & Carraro, 1999). Des Weiteren zeigen verschiedene Studien eine apoptotische Fragmentierung der DNA in den Skelettmuskeln eines Tiermodells für muskuläre Dystrophie als Folge der Dystrophin-Defizienz (Taverna et al., 1998).

Die Apoptose wird durch ein komplexes Signalnetzwerk reguliert. Ihre Signalwege können bestimmte Endoproteasen, sog. Caspasen, aktivieren, die dann zum endgültigen Eintritt des Zelltodes führen (Dirks & Leeuwenburgh, 2005). Die Caspasen wurden eingehend untersucht und als wichtige Komponenten in der Mediation der apoptotischen Signaltransduktion benannt (Earnshaw et al., 1999; Grütter., 2000; Chang & Yang., 2000; Degterev et al., 2003).

Beim Menschen sind bisher 14 verschiedene Caspasen bekannt, die in Signalkaskaden angeordnet sind. Die Mitglieder der Caspasefamilie besitzen eine einheitliche Proteinstruktur und können in drei Subfamilien eingeteilt werden: Zytokinaktivatoren (Caspase-1, -4 und -5), Apoptoseinitiatoren (Caspase -2, -8, -9 und -10) und Apoptoseeffektoren (Caspase-3, -6 und -7) (Fuentes-Prior & Salvesen, 2004).

Unter anderem stellt die Caspase-3 eine zentrale Effektorcaspase für verschiedene Apoptoseformen dar, die Proteine mit wichtiger Struktur und Funktion unmittelbar spalten kann (Ronit et al., 1997); sie gehört zu den kritischen Enzymen im Apoptoseprozess. Vor allem spielt die Caspase-3 im Skelettmuskel eine entscheidende Rolle beim Abbau des Muskelproteins (Du et al., 2004). Der Ausfall der Caspase-3 im normalen Muskel spiegelt den Widerstand der Muskelfaser gegen Apoptose wider (Sandri et al., 2001).

Abgesehen von der Funktion bei der Apoptoseregulation wirkt die Caspase-3 bei der Muskelregeneration mit (Schwerk & Schulze-Osthoff, 2003; Fernando et al., 2005; Hilder et al., 2005). Diesbezüglich kann eine erhöhte Aktivität der Caspase-3 zu intrazellulären Änderungen führen, die wiederum ein Differenzierungsprogramm, d.h. einen Zell-autonomen Effekt anregen. Weiterhin fanden Fernando et al., 2005, heraus, dass eine Hemmung der Caspase-3 eine Beeinträchtigung der Myogenese bewirkt.

#### **1.4.2 AKT Signalweg**

Die Proteinkinase B wird als Serin-/Threoninkinase bezeichnet, die als Folge der Stimulation von IGF-I aktiviert werden kann. Zudem übermitteln diese Proteinkinasen B(Akt) ihren hypertrophischen Effekt mindestens zum Teil durch die Stimulation des Proteinsynthesewegs von mTOR (mammalian Target of Rapamycin) und GSK3 $\beta$  (Glycogensynthase -Kinase-3  $\beta$ ) (Glass, 2003).

Die Aktivierung der Akt/mTOR-Signalwege kann das Muskelwachstum durch die Inhibierung der GSK-3 $\beta$  fördern. Die GSK-3 $\beta$  ist eine Serin-/Threoninkinase, die über eIF-2B (eukaryotic initiation factor-2B) die initiierte Translation hemmen kann (Hardt & Sadoshima, 2002); sie kann dabei die Proteinsynthese reduzieren. Umgekehrt inhibiert Akt-Phosphorylierung die Aktivität von GSK-3 $\beta$  (Cross et al., 1995), wodurch die Proteinsynthese zunimmt (Tidball, 2005; Bodine et al., 2001).

Im Skelettmuskel führt die Aktivierung von Akt zu einer Hypertrophieentwicklung (Bodine et al., 2001). Ferner ist eine relativ kurzfristige Aktivierung von Akt im Skelettmuskel ausreichend, um eine Hypertrophie durch Induktion des Proteinsynthesewegs zu bewirken. Somit scheint Akt die Proteinsynthese auf verschiedene Weise zu fördern (Jefferson et al., 1999).

Die genetische Unterbrechung des Akt-Signalwegs führt zu einer Schädigung im Organwachstum (Chen et al., 2001). In einer Studie konnte festgestellt werden, dass die Unterbrechung von Akt und der zugehörigen Akt2-Gene die Atrophie des Skelettmuskels neben anderen Spät komplikationen hervorruft (Peng et al., 2003). Abgesehen davon kann diese gehemmte Aktivität der Akt-Signalwege eine Abnahme der Muskelmasse bewirken (Sandri, 2008). Es wird deutlich, dass die Aktivierung von Akt für die Auslösung der Skelettmuskelhypertrophie erforderlich ist (Lai et al. 2004). Diese Aktivierung von Akt bedingt ihre PH-Domäne (Ren et al., 1997; Zong et al., 2009) und wird durch Phosphorylierung von Akt an Thr-308 und Ser-473 reguliert (Troussard et al., 2003). Die Phosphorylierung an Thr-308 ist wichtig für die Aktivierung der Akt. Die Phosphorylierung von Akt an Ser-473 bestimmt die Spezifität der Akt zu FOXO1 (Forkhead box protein O1) und FOXO3 (Forkhead box protein O3) und die geringere Aktivität der Akt (Frias et al., 2006; Guertin et al., 2006; Jacinto. 2006; Shiota et al., 2006). Während Akt an Thr-308 durch PDK-1 phosphoryliert wird, bleibt die Regulation der Aktivierung von Akt an Ser-473 unklar und umstritten (Troussard et al., 2003).

### **1.4.3 ERK Signalweg**

Der MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signalweg wird als eine Wachstumsfaktoren abhängige Signalkaskade bezeichnet (Vojtek et al. 1998). Diese Kaskaden umfassen mindestens drei serienmäßige Proteinkinasen, die in der Aktivierung einer multifunktionalen MAPK kulminieren (Lewis et al., 1998; Errede et al, 1995; Gustin et al, 1998). MAPK sind Serin-/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die auf extrazelluläre Anregungen reagieren und verschiedene zelluläre Tätigkeiten, wie zum Beispiel Differenzierung, Überleben und Apoptose der Zelle, Mitose und Genexpression regulieren (Pearson et al., 2001).

Bisher besteht die Familie der MAPK aus drei großen Gruppen: ERK, JNK und p38 MAPK (Clerk et al., 1998; Ono & Han., 2000). Unter anderem sind ERK 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2) die ersten der identifizierten MAPK-Isoformen und wichtige Effektor-kinasen am Ende einer Signaltransduktionskaskade, durch die extrazelluläre Signale in intrazelluläre Antworten umgewandelt werden. Weiterhin werden ERK 1/2 als Reaktion auf mitogene Reize einschließlich Wachstumsfaktoren über den Rezeptor der Tyrosinkinase, G-protein-gekoppelte Rezeptoren, Proteinkinase C und zellulären Stress aktiviert (van Biesen et al., 1996; Schonwasser et al., 1998).

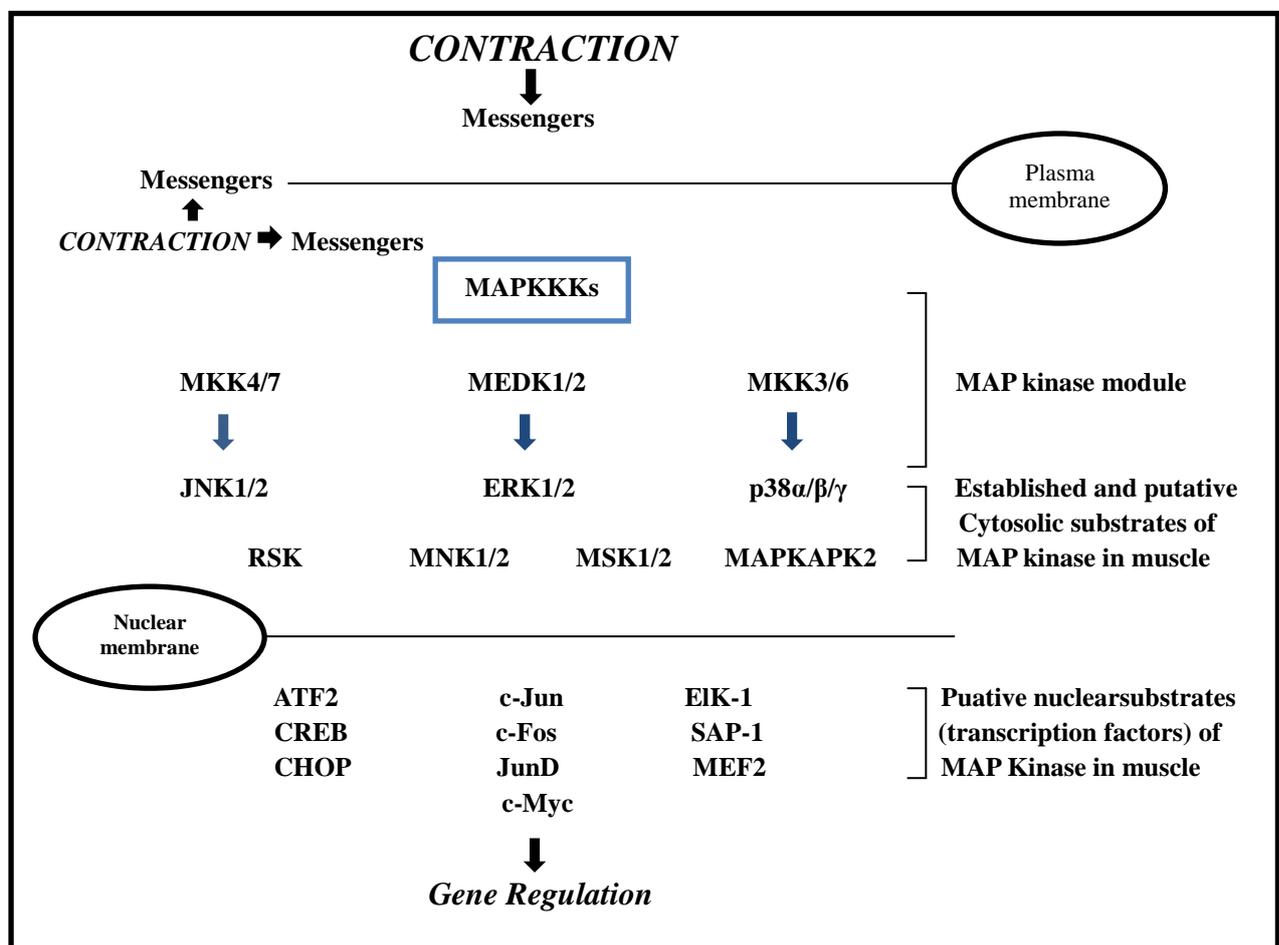


Abb.2: Die Muskelkontraktion reguliert intrazelluläre Signalmoleküle im Skelettmuskel (eigene Darstellung, modifiziert nach Sakamoto & Goodyear, 2002).

Vor allem ist die Wachstumsfaktor-vermittelte Aktivierung der ERK1/2 an Ras/Raf/MEK-Signalkaskaden beteiligt (Davis, 1993; Cohen, 1997; Ray & Sturgil, 1988).

Für diese Aktivierung der ERK ist die Phosphorylierung des Threonin- und des Tyrosin-Restes erforderlich (Her et al, 1993). Zudem ist bekannt, dass diese ERK-Signalwege in Reaktion auf Insulin, kontraktile Aktivität und Training aktiviert werden (Gosmanov et al., 2002). Unter anderem ist die Aktivität der Muskelkontraktion ein wirksamer Anreiz für die Aktivierung der ERK1/2 (Hayashi et al., 1999; Sherwood et al., 1999; Wojtaszewski et al., 1999). Des Weiteren entsteht eine erhöhte Phosphorylierung der ERK1/2 als Reaktion auf körperliche Aktivität in erheblichem Maße in den Skelettmuskelfasern (Aronson et al., 1997; Goodyear et al., 1996; Widegren et al., 2001).

## 1.4 Fragestellung

Obgleich in den letzten Jahren die Struktur und Funktion der fokalen Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Zellbiologie und Medizin weithin untersucht wurden, bleibt die Rolle des Palladin im Skelettmuskel unter Trainingsbelastung unklar.

Aus diesem Grund soll die vorliegende Arbeit die Auswirkung eines Fehlens des Palladin Exon 2 und Exon 2-4 im Skelettmuskel auf trainingsinduzierte Muskeladaptation bzw. Hypertrophie, Kapillarisierung und Fasertypisierung mittels morphologischer und histochemischer Methoden untersuchen.

Als Ziel der vorliegenden Arbeit sollen hierzu die folgenden Fragen erörtert werden.

- Beeinflusst die Palladin-Defizienz die Muskelfasergröße durch körperliches Training?
- Beeinflusst die Palladin-Defizienz die Zellkernlokalisierung durch körperliches Training?
- Beeinflusst die Palladin-Defizienz die Kapillarisierung durch körperliches Training?
- Welcher Muskelfasertyp dominiert bei KO-Mäusen unter Trainingsbelastung?
- Welche Rolle spielt die intrazelluläre Signaltransduktion bei trainingsinduzierter Muskeladaptation der KO-Mäuse?
- Welchen Einfluss hat die Palladin-Defizienz auf die Aktivierung von Caspase-3 im Skelettmuskel unter Trainingsbelastung?
- Welchen Einfluss hat die Palladin-Defizienz auf die Aktivierung von p-Akt im Skelettmuskel unter Trainingsbelastung?
- Welchen Einfluss hat die Palladin-Defizienz auf die Aktivierung von p-ERK im Skelettmuskel unter Trainingsbelastung?

## 2. Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn randomisiert in 3 Gruppen aufgeteilt. Die 3 Gruppen bestand aus Palladin Exon 2-4 Kontrollgruppe, Palladin Exon 2-4 Trainingsgruppe und Palladin Exon 2 Trainingsgruppe. Dabei wurden diese 3 Gruppen mit WT Mäusen und KO Mäusen gebildet. Die Gruppen der Tiere sind in (Tab.1) dargestellt.

Alle Versuchstiere waren weiblichen Geschlechts und zwischen 3 und 6 Monaten alt.

Die Tiere wurden einem ständigen Tageszyklus ausgesetzt, der aus festem 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus bestand. Zudem wurden sie andauernd bei einer Raumtemperatur von 20-22°C und beständiger Luftfeuchtigkeit (80%) gehalten.

Die Tiere wurden in Käfigen zu maximal fünf Mäusen gehalten und hatten Leitungswasser ad libitum und freien Zugang zum Futter.

Dieses transgene Maus-Knockoutmodell wurde von Dr. Moser am Max Planck Institut konzipiert und in der Abteilung für Molekulare Medizin des Max Planck Instituts für Biochemie in Martinsried generiert.

---

#### Palladin Exon 2-4 Kontrollgruppe: n=10

Diese Gruppe wurde mit 5 Wildtyp- und 5 Knock-out Tiere gebildet und blieb im Gegensatz zu anderen Gruppen untrainiert. Knock-out Tiere dieser Gruppe wurde das Palladin Exon 2-4 ausgeknockt.

---

#### Palladin Exon 2-4 Trainingsgruppe: n=18

Für jede der Knock-out Tiere wurde das Palladin Exon 2-4 ausgeknockt.  
Diese Gruppe wurde auch mit 9 Wildtyp- und 9 Knock-out Tiere gebildet und trainiert

---

#### Palladin Exon 2 Trainingsgruppe: n=10

Knock-out Tiere dieser Gruppe wurde Palladin Exon 2 ausgeknockt.  
Diese Gruppe wurde mit 5 Wildtyp- und 5 Knock-out Tiere gebildet und trainiert.

---

Tab. 1: Darstellung der Gruppierung der Versuchstiere

### 2.1.1 Aufbau des Trainings

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden alle Tiere der Trainingsgruppe mit Hilfe eines Laufbandes über vier Wochen fünfmal in der Woche trainiert.

Pro Bahn konnten ein bis zwei Mäuse ohne begrenzende Wirkung auf die Lauffähigkeit laufen.



Abb. 3: Drei Mäuse während der Ausdauerbelastung auf dem Laufband.

Durch ständige Beobachtung der Trainingseinheiten konnte festgestellt werden, dass alle Mäuse das vollständige Programm absolvierten. Die Trainingsgruppen trainierten mit einem Umfang von 60 min 5 Tage in der Woche mit einer Intensität von 18 Meter pro Minute bei 10 % Steigerung auf einem Laufband.

Die Mäuse wurden zunächst an das Laufbandtraining gewöhnt. Nach einigen anfänglichen Testläufen von 15-20 Minuten bei variierender Steigung und Geschwindigkeit wurden die Mäuse trainiert.

Die Erkennung individueller Tiere erfolgte mittels farblicher Markierung, die an den Schwänzen der Tiere aufgetragen wurden.

### 2.1.2 Präparation

Nach Beendigung des vierwöchig geplanten Trainingsprogramms wurde die Tiere mit Kohlenstoffdioxid betäubt und durch einen Genickbruch getötet. Um Gewebe der Tiere zu konservieren, wurden die Tiere von Prof. Dr. Bloch präpariert.

Dabei wurden die Präparate von Diaphragma, Herz und Aorta, sowie die Skelettmuskeln gastrocnemius, soleus, extensor digitorum longus und vastus lateralis entnommen und gewogen.

Ein Teil der Gewebe wurde für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für histologische und immunologische Untersuchungen wurde der andere Teil zunächst in 4% igem PFA bei 4°C fixiert und anschließend in 0.1 M PBS dreimalig gewaschen. Die Proben wurden über Nacht in 18% iger Saccharoselösung eingelegt, um sie am nächsten Tag in Tissue Tec einzubetten. Wie auch die Stickstoffpräparate wurde das Gewebe für die Kryostatschnitte so lange in einem Gefrierschrank bei -80°C gelagert, bis die Präparate für den Schneidevorgang benötigt wurden.

Die Skelettmuskeln der unteren Extremitäten wurden wie folgt behandelt:

- **Muskeln der rechten hinteren Extremität:** Die Muskeln des rechten Beines wurde halbiert, woraufhin eine Hälfte in Paraffin eingebettet wurde, die zweite erneut geteilt und zur Hälfte für die EM in PBS gelagert und zur anderen Hälfte in Tissue Tec gebettet wurde.
- **Muskeln der linken hinteren Extremität:** Die Muskeln wurden nach der Entnahme direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

## **2.2 Kryostatschnitte**

Die Anfertigung der Kryostatschnitte erfolgte mit dem Kryostat der Firma LEICA (Bensheim). Dieses funktioniert grundsätzlich nach demselben Prinzip wie ein Rotationsmikrotom innerhalb einer Gefrierkammer.

Die Gewebpräparate wurden mit dem Gewebkleber Tissue Tec auf einer Plattform festgefroren, gegen die das Messer dann durch Drehen der Kurbel bewegt werden kann.

Diese Komponenten befinden sich in einem Kasten, dessen Lufttemperatur auf -20°C heruntergekühlt wird, und der durch ein verschiebbares, durchsichtiges Kunststofffenster an der Oberseite zugänglich ist. So findet die Fixierung des Gewebes bei geöffnetem Deckel statt.

Die Objektträger wurden vor der Gewebsaufnahme außerhalb des Kühlfachs gelagert, da ihnen bei Raumtemperatur der kalte Gewebsschnitt gut anhaftet.

Dieser wurde bei einer Einstellung von 7  $\mu\text{m}$  produziert und entweder mit einem feinen Pinsel auf den Objektträger transferiert oder durch Heranhalten des Objektträgers durch dessen höhere Temperatur quasi angesogen.

Objektträger mit Gewebsschnitten wurden bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für das Anfertigen der Kryostatsschnitte wurden die Gewebeproben verwendet, die nach der Präparation direkt in flüssigem Stickstoff tief gefroren wurden.

### 2.3 Semidünnschnitte

Bei Semidünnschnitten wird das Gewebe deutlich dünner geschnitten als dies bei Kryostatsschnitten der Fall ist. Durch die Einbettung in einem deutlich härteren Medium (Araldit) können Schnitte zwischen 0,5  $\mu\text{m}$  und 2  $\mu\text{m}$  angefertigt werden.

Die Semidünnschnitte wurden aus den Gewebsteilen angefertigt, die für die elektronenmikroskopische Untersuchung prozessiert wurden. Diese lagerten nach der Präparation zunächst über Nacht in PFA(4%) und wurden dann nach einem Waschschrift in PBS (0,1 M) wie folgt behandelt:

#### Gewebe waschen und fixieren:

- Cacodylatpuffer (0,1 mol, pH: 7,2):	3 x 15 Minuten
- OsO <sub>4</sub> -Fixierung (1g OsO <sub>4</sub> in 25ml Aqua bidest.):	2 Stunden
- Cacodylatpuffer (0.1 mol, pH: 7,2):	3 x 15 Minuten

#### Dehydration:

- Ethanol (50%):	20 Minuten
- 2% Uranylacetat in 70% Ethanol:	über Nacht im Kühlschrank
- Ethanol(70%):	20 Minuten
- Ethanol(90%):	15 Minuten
- Ethanol(100%):	3 x 15 Minuten
- Propylenoxyd: Ethanol (1:1):	2 x 20 Minuten
- Propylenoxyd (100%):	2 x 20 Minuten

## **2.4 Färbemethoden**

### **2.4.1 Methylenblaufärbung**

Die Herstellung der Semidünnschnitte erfolgte mit Methylenblau. Dabei wurde das Gewebe mit einer Methylenblaulösung betropft, die sich wie folgt zusammensetzte:

- 50%: Methylenblau in 1%-igem Borax
- 50%: 1%-iges Azur II in Aqua dest.

Nach 2-3 Minute wurde die Lösung mit Aqua dest. abgespült.

### **2.4.2 Analyse der Methylenblau gefärbten Schnitte**

#### **2.4.2.1 Faserdurchmesserbestimmung**

Um Hinweise auf die Auswirkung der Palladin Defizienz auf die Hypertrophie der Skelettmuskulatur zu erhalten, wurden zunächst bei 400-facher Vergrößerung zehn zufällig ausgewählte Gewebeareale pro Maus abfotografiert.

Dazu wurde ein Mikroskop Axiophot (ZEISS, Jena) bei 400-facher Vergrößerung mit digitaler Kamera (Sony, 3CCD, Japan) und einem Computer (PC PIII, 450 MHZ) benutzt. So konnten digitale Bilder der angefärbten Gewebepräparate gespeichert werden.

Das dafür verwendete Softwareprogramm KS 300 3.0 (ZEISS, Jena) ermöglichte auch eine Kalibration.

Um einen Messwert zu erhalten wurde das Programm Scion Image (SCION CORPORATION, MARYLAND, USA) verwendet.

Mit Hilfe dieses Programms wurde die in transversaler Richtung geschnittene Muskelzelle manuell mit dem Cursor der PC-Maus umrandet.

Das Programm hat nun, nachdem diese Einstellung vorgenommen wurde, automatisch eine Ellipse berechnet, die der manuell gezeichneten, die Zelle umrandenden Form am nächsten kommt.

Dann wurde in dieser Ellipse auf halber Strecke der längsten möglichen Geraden orthogonal zu Letzterer der Abstand von der einen Seite der Ellipse zu andern gemessen.

Grund dieser Einstellung ist, dass, sollte das Bild keine optimale transversale Muskellzelle zeigen, sondern die Muskelfaser schräg oder gar longitudinal geschnitten worden sein, ein Durchmesser errechnet würde, wie er bei einem sauberen Querschnitt aufgetreten wäre.

Die Messwerte wurden dann in Exceltabellen übertragen und ausgewertet.

#### **2.4.2.2 Zellkernzählung und -lokalisierung**

Zur Erfassung der Anzahl und Lokalisation von Zellkernen wurden Methylenblau gefärbte Gewebsquerschnitte herangezogen.

Diese wurden aus Gewebe erstellt, das in Tissue Tec eingebettet war. Bei einer 400-fachen Vergrößerung wurden nun zehn zufällig ausgewählte Gewebeareale pro Maus abfotografiert. Zu diesem Zweck wurde erneut das Mikroskop Axiophot (ZEISS, Jena) verwendet, das über eine digitale Kamera (Sony, 3CCD, Japan) mit einem Pentium III PC (450 MHz) verbunden ist.

So konnten digitale Bilder der angefärbten Gewebepreparate gespeichert werden. Anschließend wurde auch hier das Softwareprogramm KS 300 3.0 (ZEISS, Jena) zur Fotografie und Kalibration (mit Hilfe des Eichobjekträgers) verwendet.

Für jedes der Tiere wurden nun pro Bild in fünf zufällig gewählten Muskelzellen die Kerne gezählt und dabei festgehalten, wie viele der letzteren peripher in der Zelle lagen.

Dies wurde an je 10 Bildern durchgeführt, so dass pro Maus 50 Zellen ausgezählt wurden. Tiere, bei denen schlechte Gewebsqualität oder ein Mangel an transversalen Muskelquerschnitten dazu führten, dass nicht genug Zellen ausgewertet werden konnten, wurden aus der Wertung genommen.

### **2.4.2.3 Kapillarisation**

Die Messung der Kapillarisation erfolgte, ähnlich der Erfassung der Zellkerne, durch ein Auszählverfahren.

Hierzu wurden pro Tier und Muskel mindestens 50 Muskelzellquerschnitte ausgewählt und die Kapillaren, die jede Zelle umgaben, gezählt.

Somit wurden Kapillaren bei benachbarten Zellen doppelt oder sogar öfter gezählt, so dass diese Methode keine Aussage über die Anzahl der Kapillaren insgesamt zulässt, sondern nur über die vaskuläre Versorgung der jeweiligen Muskelfasern.

### **2.4.3 Succinatdehydrogenasefärbung**

Die SDH ist ein Enzym, das im Zitronensäurezyklus eine Rolle spielt. Bei Durchführung der Succinatdehydrogenasefärbung wird die Typisierung der Muskulatur anhand der Dichte der Mitochondrien evident.

ST Fasern (Typ 1) enthalten deutlich mehr Mitochondrien als Muskelzellen vom FT Fasertyp (Typ IIb/x).

Die ST Fasern werden bei dieser Methode somit stärker gefärbt und haben im Vergleich einen höheren Grauwert als der Hintergrund oder FT-Fasern.

Um eine SDH Färbung durchzuführen, wurden Schnitte der in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebe mit Hilfe des Kryostats erstellt.

Hier wurden je drei 7µm dicke Gewebeproben auf einem Objektträger platziert. War eine Küvette mit Präparat tragenden Objektträgern voll, so wurde diese aus dem -20°C Bereich des Kryostats herausgenommen.

Auf jedem Objektträger wurde dann mit einem Fettstift um jedes Gewebestück ein Kreis aufgetragen. Nachfolgend wurde mit Hilfe einer Pipette in jeden dieser Kreise die Färbelösung geträufelt, wobei der Fettkreis ein Verlaufen der Flüssigkeit verhinderte.

Die Färbelösung zur Anfärbung von Succinatdehydrogenase setzt sich wie folgt zusammen:

- 5ml 50 mM Tris-HCl pH 7,4
- 5ml 0,2 M Natrium-Succinat(Brensaure)
- 1ml 50 mM MgCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O
- 9ml Nitroblau-Tetrazoliumchlorid(NBT)

Nachdem diese Lösung auf jedes Gewebeelement aufgetragen wurde, wurden die Objektträger in Plastikschaalen transferiert, in denen sie durch schmale Balken wenige mm über einem Wasserbecken gehalten wurden. In dieser Anordnung wurden diese feuchten Kammern bei 37 °C für ca. eine Stunde in einem Inkubator platziert.

Der Wirkmechanismus dieser Färbung ist wie folgt:

Das Substrat des Enzyms Succinatdehydrogenase ist das Anion Succinat, das im Zitronensäurezyklus als Elektronendonator in der Elektronentransportkette fungiert. Die Färbelösung enthält sowohl Succinat, das Substrat des Enzyms Succinatdehydrogenase, als auch einen Farbstoff, der das Produkt (Fumarat) anfärbt. Dieser Farbstoff ist das Nitroblau.

Der Vorgang der enzymatischen Reaktion und die Anfärbung des Produkts durch den Farbstoff erfolgten während der Inkubation. Nach Entnahme aus dem Inkubator wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. abgespült, luftgetrocknet und mit Glyceringelatine (Kaisers Glycerine) eingedeckt.

#### **2.4.3.1. Auswertung der SDH-Färbung**

Zur Auswertung erfolgte die Messung der Dichte am selben PC wie bei der Zelldurchmesserbestimmung (2.4.2.1).

Anschließend wurde jede Zelle mit dem Programm Image J umrandet. Es wurde darauf geachtet, die Zelle genau zu umranden.

Das Programm hat den Grauwert der Zelle automatisch gemessen und in arbitrary units (au) angegeben.

Da die Lichtdurchlässigkeit der diversen Zellen objektiviert werden musste, wurde vor der Aufnahme pro Bild an drei Stellen der zellfreie Hintergrund gemessen und die Heiligkeit so eingestellt, dass die Schattierung des Hintergrundes bei  $215 \pm 5$  au lag.

In Excelltabellen wurde nach der Datenaufnahme der Wert jeder Zelle von dem Hintergrundwert des jeweiligen Bildes abgezogen, so dass am Ende pro Zelle die relative Lichtdurchlässigkeit feststand.

Je geringer die Lichtdurchlässigkeit, das heißt je größer die Differenz des Wertes der Zelle zu dem des Hintergrundes, desto mehr Succinatdehydrogenaseaktivität weist die Zelle auf.

Die Messung wurde pro Tier an 50 Zellen durchgeführt.

Um einen genaueren Einblick in die Verteilung der Graustufen zu erhalten, wurde nach der Betrachtung der Mittelwerte eine Einteilung der Messwerte in Unterguppen vorgenommen.

Folgendes Spektrum wurde zur Gruppeneinteilung herangezogen:

<20	20-40	40-60	60-80	80-100	100-120	>120
-----	-------	-------	-------	--------	---------	------

Tab. 2: Gruppeneinteilung zur genaueren Betrachtung der SDH-Verteilung ( in arbitrary units)

#### **2.4.4 Immunhistochemie**

In der Immunhistochemie wird die Spezifität von Antikörper genutzt, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Dazu eignen sich besonders Antigene, die spezifisch nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben auftreten. Wie in 2.2 für Kryostatschnitt beschrieben, wurde ein Teil des Muskelgewebes für die Immunhistochemie verwendet. Für die Immunlokalisationen wurde an Kryostatschnitten ein Verfahren zur indirekten Antigenmarkierung verwendet, wobei ein spezifischer Sekundärantikörper an den antigenspezifischen Primärantikörper gebunden wurde. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen das Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde.

An den Sekundärantikörper wird durch eine Verbindung zwischen Biotin und Avidin ein Peroxidase-Komplex (HRP) angelagert. Zur Visualisierung des gesamten Antikörper-Komplexes werden verschiedene Chromogene verwendet (z.B. DAB), die an die Peroxidase des HRP binden

Das Ergebnis dieser Reaktion konnte per Lichtmikroskop betrachtet werden.

Es wurde ein Standard Färbeprotokoll verwendet. Dabei wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem hydrophoben PAP-Pen Makierstift umrandet.

### **- TBS Waschen**

Zunächst wurden die fixierten Schnitte dreimal 10 min mit TBS gewaschen.

**TBS 0.05 M (pH 7.6):**      6.057 g    Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  
                                         8.8 g      NaCl (= 150 mmol)  
                                         80 ml     HCl (Hydrochlorid= 1n) auf pH7.6  
                                         15 ml     Tween20  
                                         mit a dest, auf 1000 ml auffüllen.

### **- Hemmung der endogenen Peroxidase**

Da die endogene Peroxidase im Gewebe vorkommt, musste diese gehemmt werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Nach drei Waschschritten mit TBS erfolgte eine Hemmung der endogenen Peroxidase durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die zur Blockierung der endogenen Peroxidase notwendige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde kurz vor dem Gebrauch angesetzt und in jedes Gewebe gegeben.

Die Inkubation erfolgte 20 min bei Raumtemperatur.

**Hemmung der endogene Peroxidase:**    20 ml    Methanol  
                                                         4.5 ml    H<sub>2</sub>O  
                                                         5 ml     H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### - Permeabilisierung der Zellmembran

Nach zwei Waschschritten mit TBS (je 10 min) wurde in TBS gelöstes Ammoniumchlorid und 0.25% Triton X für 10 min hinzugefügt.

Das Ammoniumchlorid bewirkt eine Auflösung der Aldehydvernetzungen und Demaskierung des Gewebes, während das Detergenz Triton X die Membran auflöst.

Somit wurde die Plasmamembran permeabilisiert, um dem Antikörper den Zugang zum Zytoplasma zu ermöglichen.

Permeabilisierung der Zellmembran:	0.5 M	Ammoniumchlorid
	+ 0.25 %	Triton X in TBS
	0.59 g	Ammoniumchlorid
	50 µl	Triton X-100
	20ml	TBS

### - Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Nach zwei weiteren Waschschritten mit TBS (je 10 min) erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch 5% BSA in TBS für 60 Minuten.

Damit war die Vorbehandlung der Präparate abgeschlossen und es konnte mit der eigentlichen Immundetektion begonnen werden.

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen: TBS 10ml + BSA 0,5 g

### - Inkubation mit primärem Antikörper

Die Zellen wurden mit folgenden primären Antikörpern in den angegebenen Verdünnungen (Tab. 1) in 0.8% BSA-Lösung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der primäre Antikörper war gegen die jeweiligen Antigene/Proteine gerichtet, die detektiert werden sollten. Die Inkubationsphase erfolgte in einer feuchten Kammer, um die Austrocknung des Präparates zu vermeiden.

Inkubation mit primärem Antikörper: TBS 5ml + BSA 0,04g + primärer Antikörper

<b>Verwendete Antikörper</b>			
Antikörper	Hersteller	Horst	Verdünnung
Caspase 3	BD-Pharmingen	Rabbit	1:500
p-Akt(Thr 308)	Cell Signaling	Rabbit	1:500
p-Akt(Ser 473)	Cell Signaling	Rabbit	1:500
p-Erk	Sigma	Maus	1:400

Tab. 3: Verwendete primäre Antikörper

- Inkubation mit sekundärem Antikörper

Am nächsten Tag folgte das viermalige Waschen mit TBS (je 10 min). Anschließend wurden die Zellen mit den folgenden aufgeführten sekundären Antikörpern in den angegebenen Verdünnungen bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert (Tab.2).

Der sekundäre Antikörper bindet nun an das freie Ende des primären Antikörpers.

Inkubation mit sekundärem Antikörper: TBS 5 ml + sekundärer Antikörper

Sekundäre Antikörper	Verdünnung
Goat anti rabbit biotin ( Dako Hambrug, D)	1:400
Goat anti mouse biotin( Dako Hambrug, D)	1:400

Tab. 4: Sekundäre Antikörper und ihre Verdünnung

### - Inkubation mit dem Horseradisch Peroxidasekomplex

Nach erneutem viermaligem Waschen mit TBS (je 10) wurden die Zellen mit dem Horseradisch Peroxidase (HRP) komplex für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die enzymatische Färbereaktion mit DAB vorzubereiten. Damit waren die erforderlichen Antikörper und gebundenen Enzymlabel für Immundetektion angefertigt.

Die Peroxidase wurde im Verhältnis 1:150 mit TBS verdünnt.

**Inkubation mit HRP- komplex:** TBS 10ml + HRP-Komplex 66,67 ul

### - DAB-Entwicklung

Nach 4 Waschgängen mit TBS (je 10 min) wurde im letzten Schritt eine DAB-Entwicklung durchgeführt. Zur Entwicklung der Immunfärbung wurde eine DAB-Lösung in Phosphatpuffer (PB) angesetzt und auf die Schnitte aufgetragen. Die Zellen wurden in der DAB-Lösung für ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das DAB durch den HRP-Komplex umgesetzt, was eine bräunliche Farbreaktion an den Stellen auslöste, wo das zu untersuchende Protein im Gewebe lokalisiert war.

Nach der Entwicklung wurden die Zellen 3mal mit TBS (je 5 min) gewaschen.

**0.1 M Phosphatpuffer(PH 7.4):** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O 14.4g  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O 2.6g  
 Mit a.dest, auf 1000 ml auffüllen.

**DAB-Lösung(15 ml 0.1m PB):** 150 ul DAB- Lösung(=7.5 mg)  
 150 ul NH<sub>4</sub>Cl(=6.0 mg)  
 300 ul NiSo<sub>4</sub>(=0.05 M)  
 300 ul 10%ige Glucose  
 50 ul Glucoseoxidase

### **- Entwässerung und Eindecken**

Zuletzt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Nach einer kurzen Inkubation in Xylol wurden die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckt und mit einem Deckgläschen versiegelt.

Entwässerung:	In 70 % Ethanol	5 Minuten
	In 96 % Ethanol	5 Minuten
	In 100 % Ethanol	5 Minuten
	In Xylol	10 Minuten

### **- IHC Kontrolle**

Zur Kontrolle für einen erfolgreichen Färbeprozess wurde eine immunhistochemische Kontrollfärbung (IHC) durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der Färbetechnik zu sichern und unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen. Dabei wurden alle Schritte des immunhistochemischen Standard Protokolls mitgemacht, nur statt der primären Antikörper wurde 0.8% BSA aufgetragen.

#### **2.4.4.1 Auswertungen der Immunhistochemie**

Zur Analyse der immunhistochemischen Färbung wurde ein Mikroskop „KS300 Axiophot“ der Firma Zeiss (Jena, D) bei 40-facher Vergrößerung mit digitaler Kamera (Sony, 3CCD, Japan) und einen Computer (PC PIII, 450 MHz) benutzt. Durch die Verwendung des Programms „KS 300 3.0“ war es möglich die Färbeargebnisse der Präparate festzuhalten. Zunächst wurden pro Präparat mindestens 50 Zellen von zwei bis drei Gewebeschnitten ausgewählt.

Sie wurden mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera mit 40-facher Vergrößerung fotografiert und durch eine Graustufenmessung mit der Software „Image J“ gemessen.

Die Farbdichtemessung der Zellen wurde gegenüber dem Hintergrund gemessen. Der Wert des Hintergrundes wurde als zellfreier Bereich des Gewebeausschnitts definiert. Als Standardisierung erfolgte eine dreimalige Hintergrundmessung, aus dem der Mittelwert gebildet wurde und der bei einer Intensität von  $215 \pm 5$  Du (Density Unit) liegen sollte. Aus den Werten der Graustufenmessung wurden als statistische Größe die arithmetrischen Mittelwerte und deren Standardabweichung berechnet.

## **2.5 Statistik**

Alle statistischen Berechnungen und Darstellungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS, Version 17.0 und mit Microsoft Excel 2003 durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung SD (Standard Deviation) angegeben.

Ein Vergleich der Gruppen und die Ermittlung der Signifikanzen erfolgten mit einfaktorieller ANOVA (analysis of variance). Bei der Post-hoc-Analyse kam Bonferroni-Test zu Anwendung. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurden die Unterschiede als signifikant bezeichnet (Kennzeichnung mit \*).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Muskelfaserdurchmesser

Die Muskelfasern sowohl im M. gastrocnemius als auch im M. vastus lateralis der WT Mäuse sind im Vergleich zu KO Mäusen innerhalb der jeweiligen Gruppen zwar größer, jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant.

Es ist deutlich erkennbar, dass der Muskelfaserdurchmesser der WT Mäuse unter Trainingsbelastung geringfügig größer ist als derjenigen mit Palladin-Defizit.

Bei der Analyse des M. gastrocnemius konnte festgestellt werden, dass das vierwöchige Training bei den WT- und KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe zu einer leichten Zunahme der Muskelfasergröße führt. Dabei gab es keinen Unterschied in der trainingsinduzierten Veränderung der Muskelfasergröße zwischen den WT- und KO-Mäusen.

Beim Vergleich der Muskelfasergröße in der Exon 2 Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen festgestellt werden.

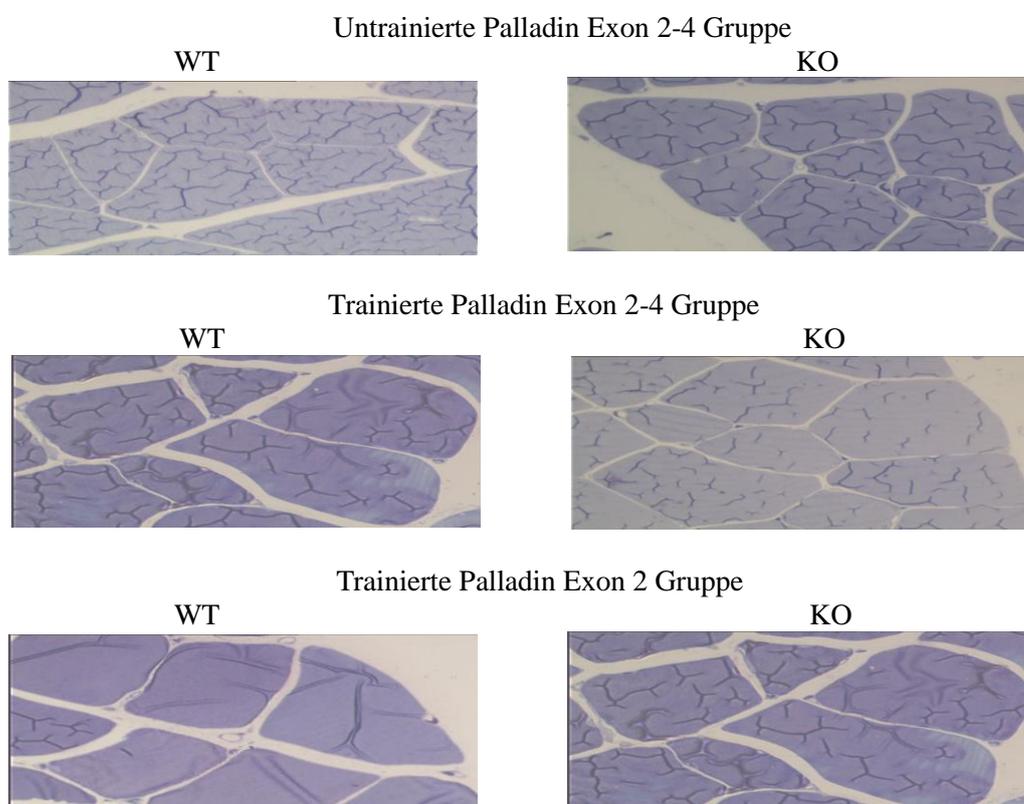
Bei der Analyse des M. vastus lateralis zeigte sich eine signifikante Zunahme der Muskelfasergröße durch das Training bei den WT- und KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe. Dabei ergab sich kein Unterschied in der trainingsinduzierten Zunahme der Muskelfasergröße zwischen den WT- und KO-Mäusen. Beim Vergleich der Muskelfasergröße in der Exon 2 Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen festgestellt werden.

Die Ergebnisse für Muskelfasergrößen sind in Tab. 5 und 6 dargestellt und als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
Type	1 WT n=5	2 KO n=4	3 WT n=6	4 KO n=8	5 WT n=4	6 KO n=5
Zelldurchmesser ( $\mu\text{m}$ ) (MW/SD)	30.6 $\pm 3.4$	28.8 $\pm 2.4$	39.4 $\pm 5.6$	37.8 $\pm 3.8$	45.2 $\pm 4.5$	39 $\pm 7.4$
p-wert	--	--	--	p=0.82 (4 zu 2)	--	--

Tab. 5: Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) für Faserdurchmesser im M. gastrocnemius. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT (Trainierte Exon2-4 Gruppe), 4= KO (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT (Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO (Trainierte Exon 2 Gruppe).

#### Muskelfaserdurchmesser im M. gastrocnemius



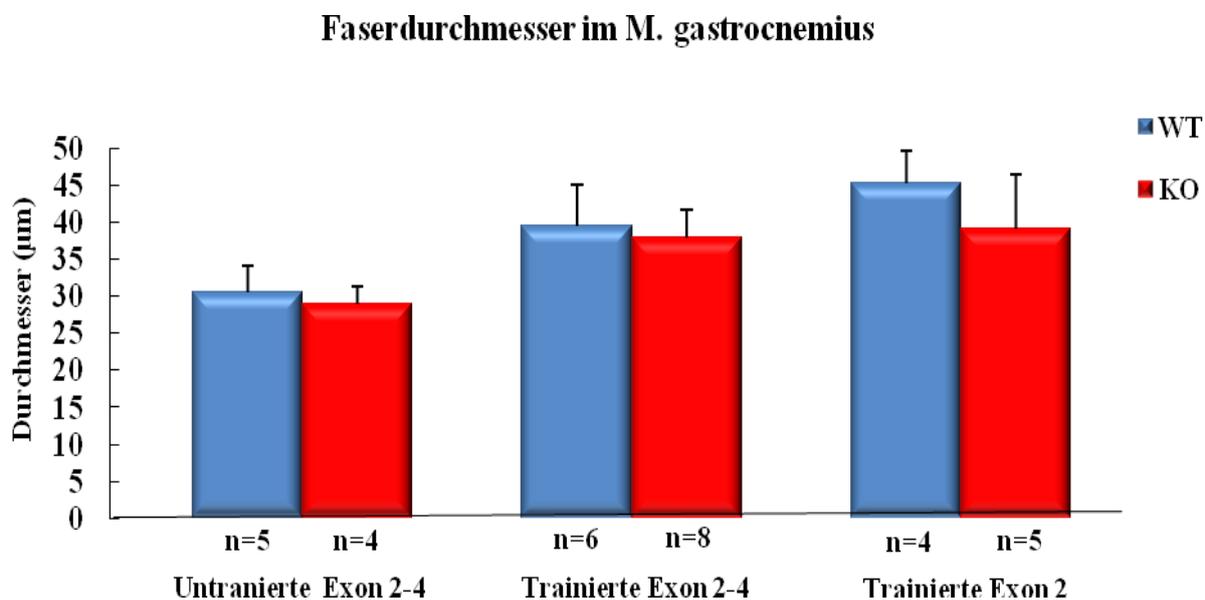
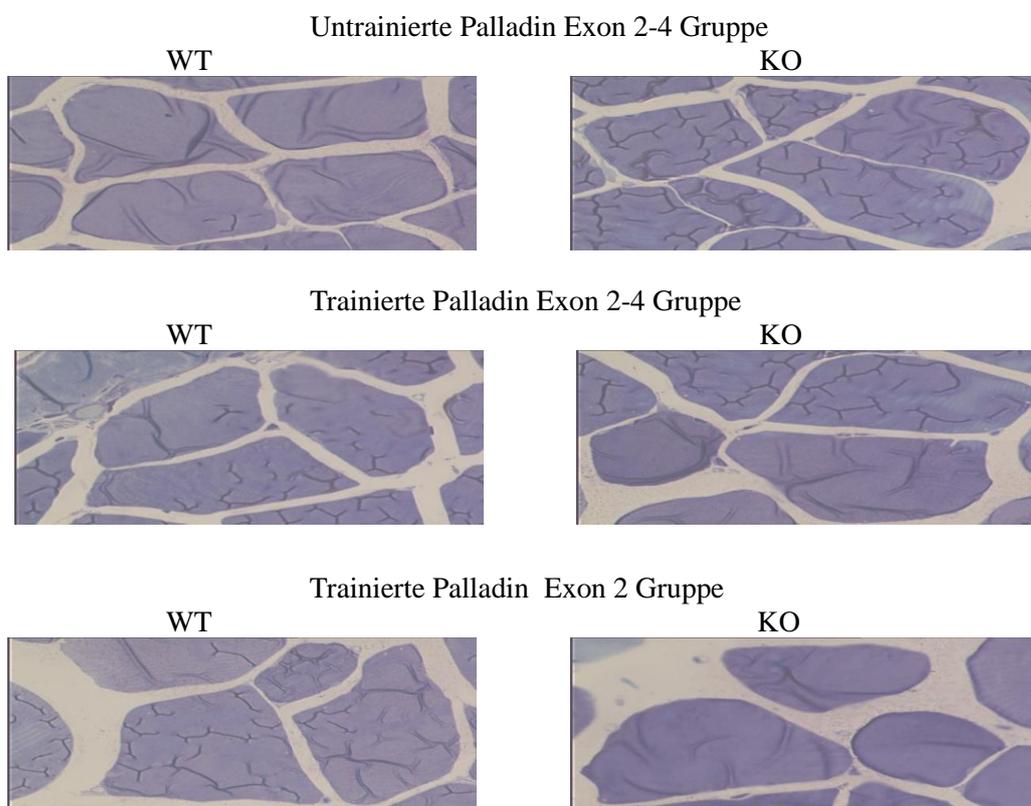


Abb. 4: Vergleichende graphische Darstellung der Muskelfaserdurchmesser im M. gastrocnemius.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=3	2 KO n=5	3 WT n=8	4 KO n=9	5 WT n=5	6 KO n=5
Zelldurchmesser (µm) (MW/SD)	34.1 ±3.6	29.7 ±5.9	46.5 ±5.5	42.2 ±5.9	46.6 ±7.1	38.8 ±3
p=Wert	p=0.039 (1 zu 3)	--	--	p=0.006 (4 zu 2)	--	--

Tab. 6: Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) für Faserdurchmesser im M. vastus lateralis. 1= WT ( Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO ( Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT (Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO (Trainierte Exon 2 Gruppe).

### Muskelfaserdurchmesser im M. vastus lateralis



### Faserdurchmesser im M. vastus lateralis

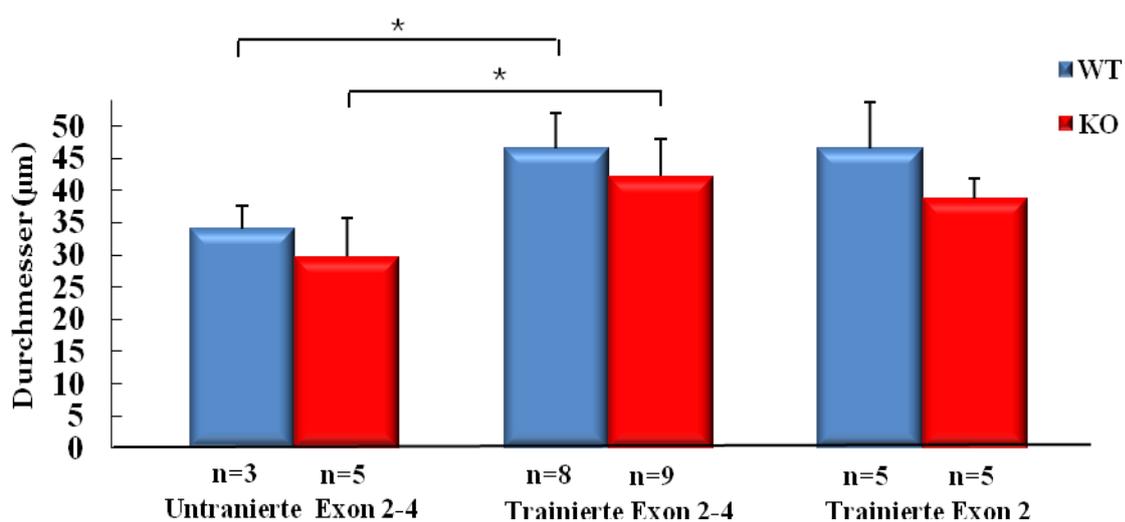


Abb. 5: Vergleichende graphische Darstellung der Muskelfaserdurchmesser im M. vastus lateralis.

### 3.2 Zellkernlokalisierung

Bei der Analyse peripherer Zellkernlokalisierung im M. gastrocnemius konnte festgestellt werden, dass es durch Training zu einer signifikanten Abnahme der peripheren Zellkernzahl bei den WT- und KO Mäusen in Exon 2-4 Gruppe kommt.

Die Analyse der zentralen Zellkernlokalisierung im M. gastrocnemius dagegen zeigte eine signifikante Zunahme der zentralen Zellkernzahl durch das Training bei den WT- und KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe. Dabei gab es keinen Unterschied in der trainingsinduzierten Veränderung der Zellkernlokalisierung zwischen den WT- und KO-Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe.

Beim Vergleich der Zellkernlokalisierung in der Exon 2 Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen festgestellt werden.

Bei der Analyse des M. vastus lateralis konnte festgestellt werden, dass das vierwöchige Training nur bei den WT Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe und zu einer signifikanten Abnahme der peripheren Zellkernzahl führt. Bei den KO Mäusen bewirkte das Training keine signifikante Veränderung.

Die Analyse der zentralen Zellkernlokalisierung des M. vastus lateralis zeigte unter Trainingsbelastung eine signifikante Erhöhung der zentralen Zellkernzahl bei den WT Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe. Dabei gab es keinen Unterschied in der trainingsinduzierten Veränderung der Zellkernlokalisierung zwischen den WT- und KO-Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe.

Beim Vergleich der Zellkernlokalisierung in der Exon 2 Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 7-10 dargestellt und als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=4	3 WT n=6	4 KO n=8	5 WT n=4	6 KO n=5
Prozentualer Anteil peripherer Zellkernzahl (%-Werte) (MW/SD)	97 ±0.9	96.9 ±1.2	89.2 ±3.7	91.2 ±1.5	92.6 ±0.4	94.5 ±0.9
p=Wert	--	--	p=0.00 (3 zu 1)	p=0.001 (4 zu 2)	--	--

Tab. 7: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für periphere Zellkernzahl im M. gastrocnemius. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO (Trainierte Exon 2 Gruppe).

Gruppe	Untrainierte Exon 2 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=4	3 WT n=6	4 KO n=8	5 WT n=4	6 KO n=5
Prozentualer Anteil peripherer Zellkernzahl (%-Werte) (MW/SD)	2.9 ±0.9	3 ±1.2	10.9 ±3.7	8.8 ±1.5	7.4 ±0.4	5.4 ±0.9
p=Wert	p=0.00 (1 zu 3)	p=0.001 (2 zu 4)	p=0.00 (3 zu 1)	p=0.001 (4 zu 2)	--	--

Tab. 8: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für zentrale Zellkernzahl im M. gastrocnemius. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

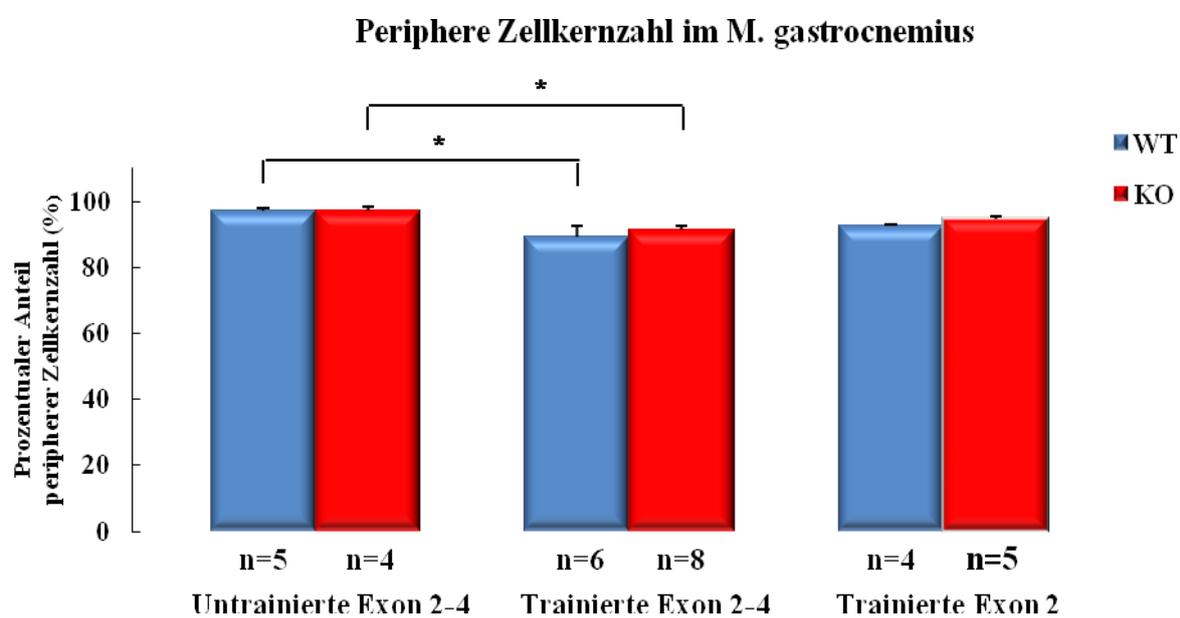


Abb. 6: Vergleichende graphische Darstellung peripherer Zellkernzahl im M. gastrocnemius.

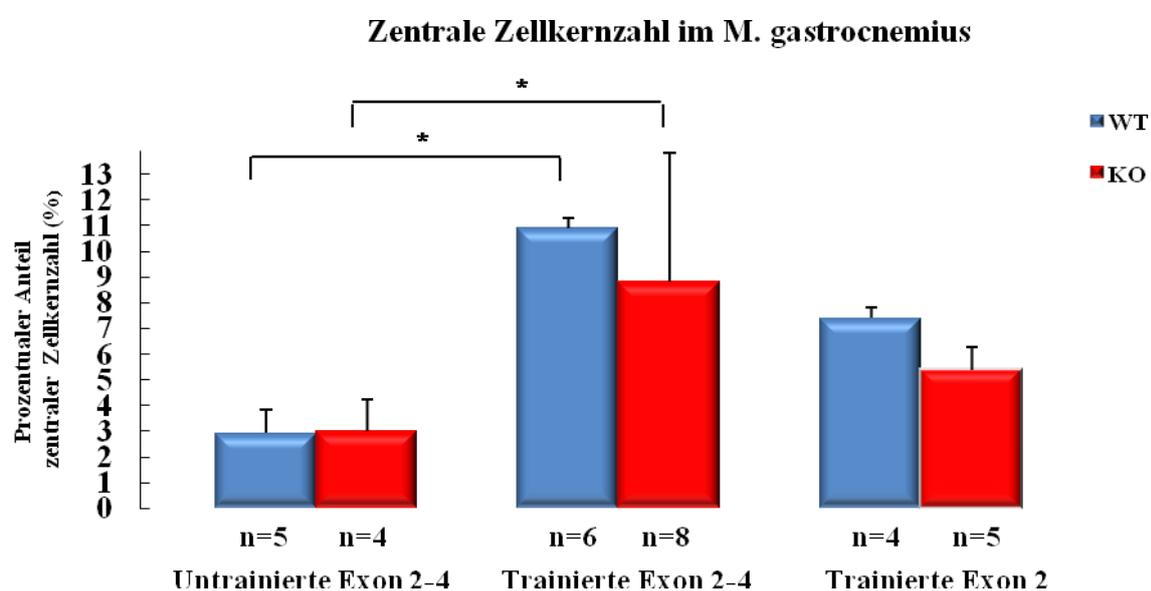


Abb. 7: Vergleichende graphische Darstellung zentraler Zellkernzahl im M. gastrocnemius.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=3	2 KO n=5	3 WT n=8	4 KO n=9	5 WT n=5	6 KO n=5
Type						
Prozentualer Anteil peripherer Zellkernzahl (%-Werte) (MW/SD)	97 ±0.6	97.6 ±0.5	90 ±2.5	93.6 ±3.9	92.3 ±1.8	94.2 ±0.8
p=Wert	p=0.003 (1 zu 3)	p=0.12 (2 zu 4)	p=0.03 (3 zu 1)	p=0.12 (4 zu 2)	--	--

Tab. 9: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für periphere Zellkernzahl im M. vastus lateralis. 1= WT(Untrainierte Exon2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=3	2 KO n=5	3 WT n=8	4 KO n=9	5 WT n=5	6 KO n=5
Type						
Prozentualer Anteil peripherer Zellkernzahl (%-Werte) (MW/SD)	2.6 ±0.6	2.4 ±0.5	9.9 ±2.5	6.5 ±3.9	7.7 ±2.1	5.7 ±0.9
p=Wert	p=0.05 (1 zu 3)	--	p=0.05 (3 zu 1)	--	--	--

Tab. 10: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für zentrale Zellkernzahl im M. vastus lateralis. 1= WT(Untrainierte Exon2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

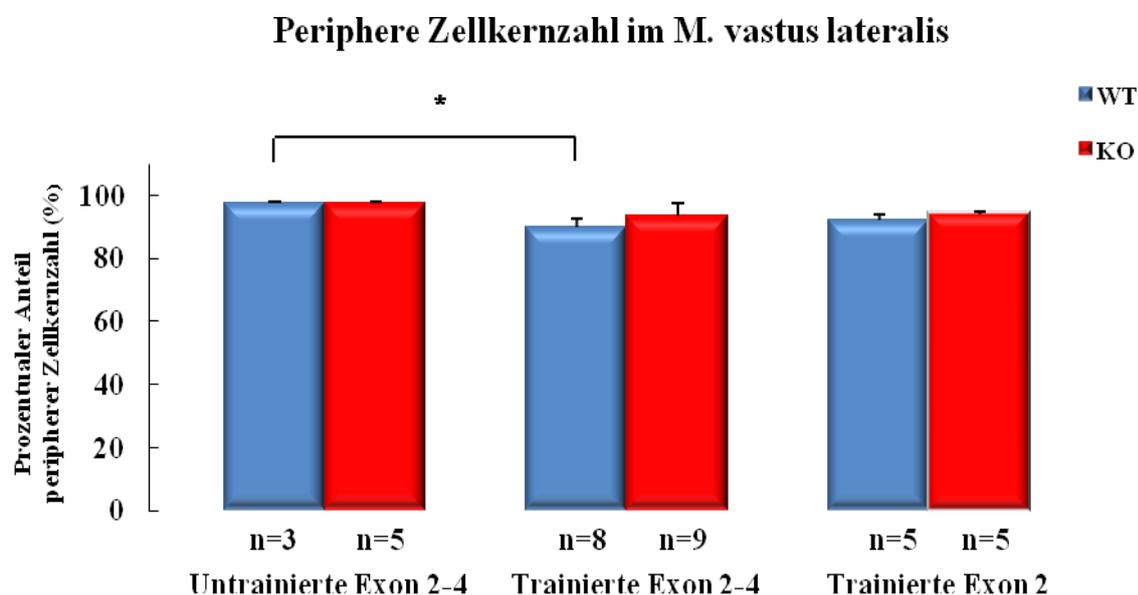


Abb. 8: Vergleichende graphische Darstellung peripherer Zellkernzahl im M. vastus lateralis.

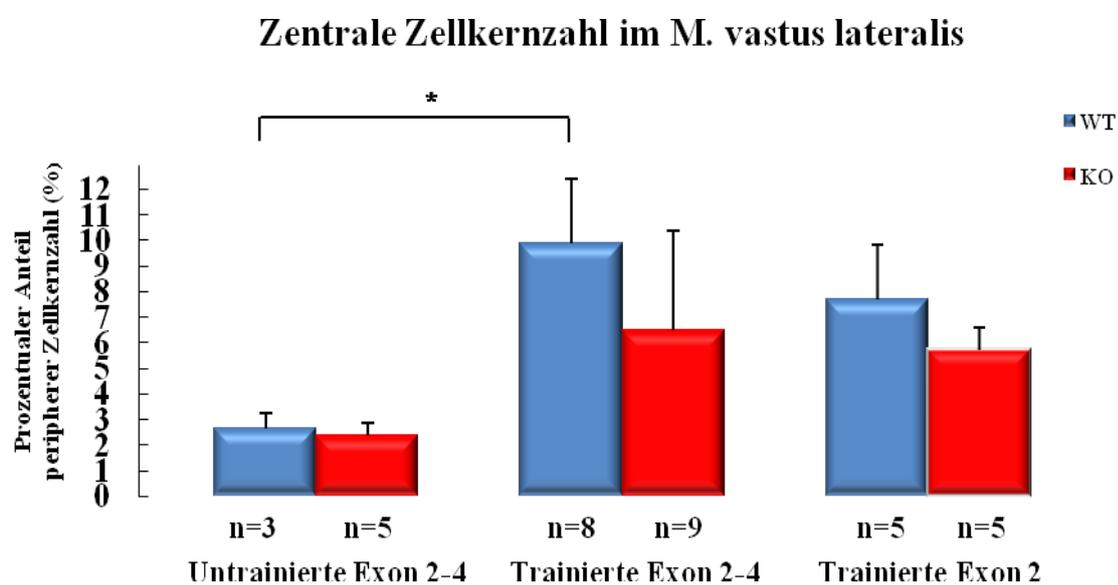


Abb. 9: Vergleichende graphische Darstellung zentraler Zellkernzahl im M. vastus lateralis.

### 3.3 Kapillarisation.

Beim Vergleich der Kapillarisation ergaben sich keine Unterschiede zwischen WT- und KO Mäusen innerhalb der einzelnen Gruppen.

Bei der Analyse der Kapillarisation im M. gastrocnemius konnte festgestellt werden, dass es durch Training zu keiner Veränderung der Kapillarzahl bei den WT- und KO Mäusen in Exon 2-4 Gruppe kommt. Dabei gab es keinen Unterschied in der trainingsinduzierten Kapillarisation zwischen den WT- und KO-Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe.

Beim Vergleich der Kapillarzahl in der Exon 2 Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen festgestellt werden.

Die Analyse der Kapillarzahl im M. vastus lateralis zeigte unter Trainingsbelastung keine Zunahme der Kapillarzahl bei den WT- und KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe. Dabei gab es keinen Unterschied in der trainingsinduzierten Kapillarisation zwischen den WT- und KO-Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe.

Beim Vergleich der Kapillarzahl in der Exon 2 Gruppe konnte kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sind in Tab. 11 und 12 dargestellt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
Type	1 WT n=5	2 KO n=4	3 WT n=5	4 KO n=8	5 WT n=4	6 KO n=5
Kapillanzahl pro Muskelfaser (MW/SD)	3.9 ±1.1	4.7 ±0.5	4.4 ±1.4	4.7 ±1.6	3.9 ±0.9	4.7 ±0.9
p-Wert	p=1.0 (1 zu 2)	p=1.0 (2 zu 4)	p=1.0 (1 zu 3)	--	--	--

Tab. 11: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Kapillanzahl im M. gastrocnemius. 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

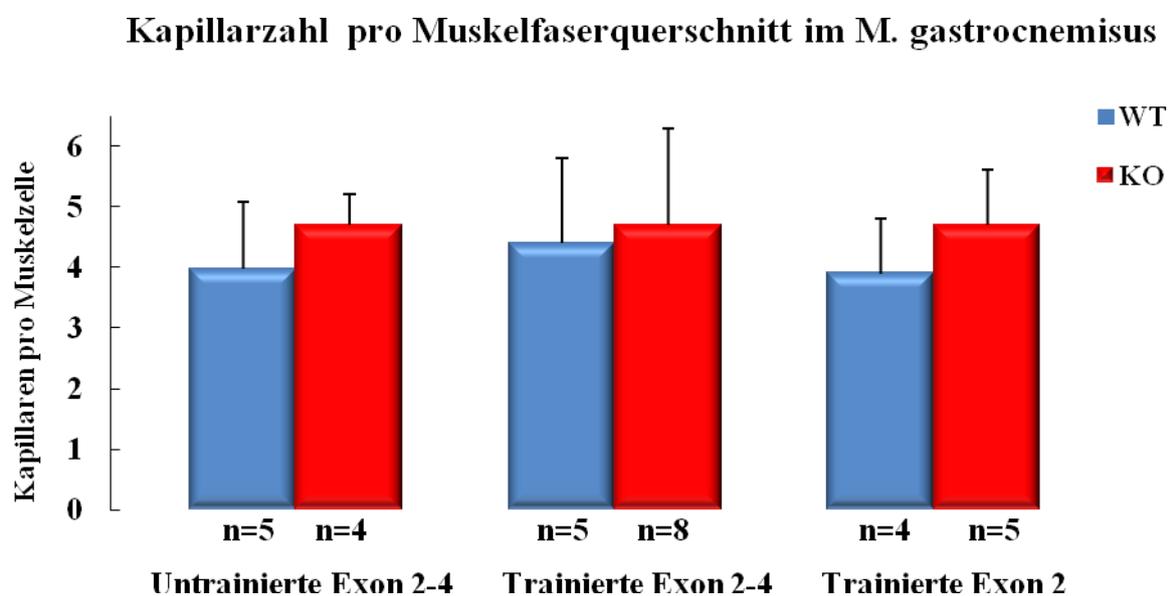


Abb. 10: Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Kapillarisation im M. gastrocnemius

Gruppe	Untrainierte Exon2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=3	2 KO n=5	3 WT n=8	4 KO n=9	5 WT n=5	6 KO n=5
Kapillarzahl pro Muskelfaser (MW/SD)	4.5 ±1	6.5 ±1.5	4.7 ±1.2	5.1 ±1.5	4.4 ±0.7	4.5 ±0.7
p-Wert	p=0.52 (1 zu 2)	p=0.76 (2 zu 4)	p=1.0 (1 zu 3)	--	--	--

Tab.12: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Kapillarzahl im M. vastus lateralis. 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### Kapillarzahl pro Muskelfaserquerschnitt im M. vastus lateralis

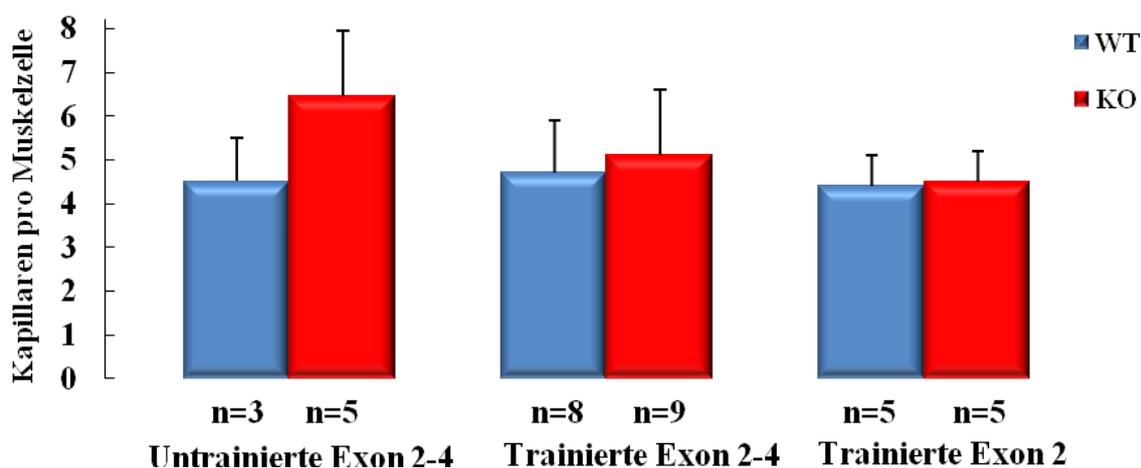


Abb. 11: Vergleichende graphische Darstellung der Kapillarisation im M. vastus lateralis.

### 3.4 Muskeltypisierung

Bei der Analyse der SDH-Aktivität im *M. gastrocnemius* (Abb. 12) konnte festgestellt werden, dass im untrainierten Zustand die Exon 2-4 KO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen einen größeren Anteil am Fasertyp-I aufweisen. Bei den Exon 2-4 KO Mäusen ließ sich eine signifikante Abnahme der SDH-Aktivität in den Bereichen 0-20, 20-40 und 40-60 als Anzeichen für den Fasertyp-II beobachten. In den Bereichen 80-100 und  $100\leq$  als Anzeichen für den Fasertyp-I zeigten KO Mäuse eine höhere SDH-Aktivität als WT Mäuse.

Im trainierten Zustand ließ sich kein Unterschied in der Verteilung der SDH-Aktivität zwischen den WT- und den KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe beobachten. Die WT- und KO Mäusen wiesen eine erhöhte SDH-Aktivität in den Bereichen zwischen 0 und 40 und eine gleichzeitige Verringerung in den Bereichen zwischen 80 und  $100\leq$  auf.

In der Exon 2 Gruppe konnte ebenfalls kein Unterschied in der Verteilung der SDH-Aktivität zwischen den WT- und den KO Mäusen beobachtet werden. Die WT- und KO Mäuse wiesen eine erhöhte SDH-Aktivität in den Bereichen zwischen 0 und 60 und eine Verringerung in den Bereichen zwischen 60 und  $100\leq$  auf.

Anhand dieser Verteilung der SDH-Aktivität war in den beiden Gruppen ein hoher Anteil des Fasertyps-II zu erkennen.

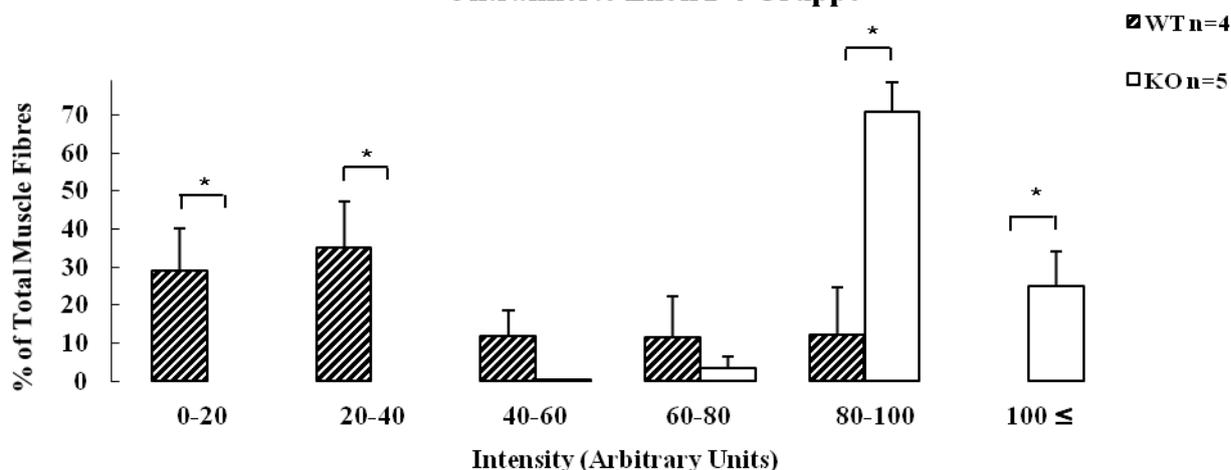
Die WT Mäuse zeigten keine Verschiebung des Faserspektrums, wobei es unter Trainingsbelastung in allen Bereichen zu keiner Veränderung der SDH-Aktivität kam.

Bei den Exon 2-4 KO Mäusen kam es zu einer trainingsbedingten Verschiebung des Faserspektrums in Richtung des Muskelfasertyps-II. Im Vergleich zum untrainierten ließ sich im trainierten Zustand eine höhere SDH-Aktivität in den Bereichen 0-20 und 20-40 beobachten, wobei sich eine Abnahme der SDH-Aktivität in den Bereichen 80-100 und  $100\leq$  zeigte.

Die Einteilung für verschiedene Grauwertstufen und die densitometrischen Messergebnisse für WT- und KO-Mäuse sind in Abb. 12 dargestellt.

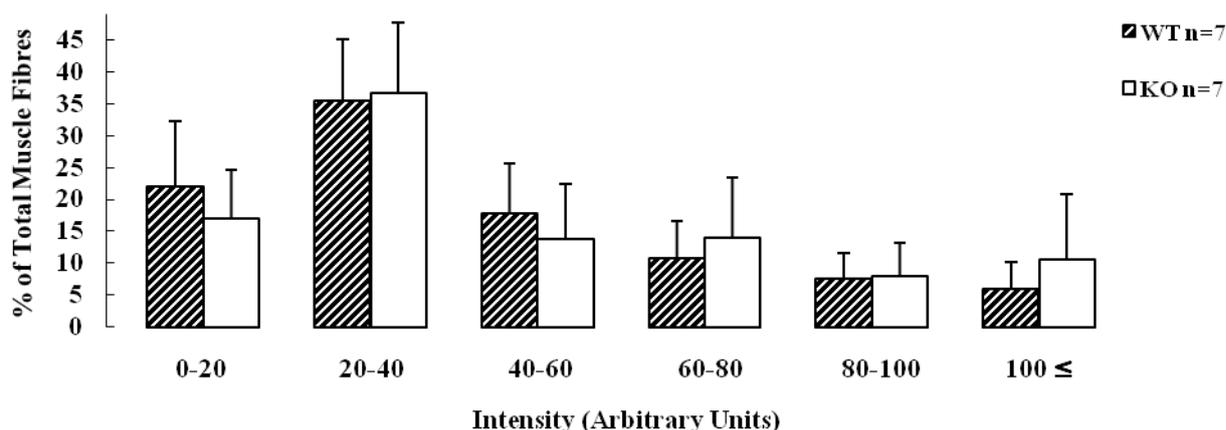
**Succinatdyhydrogenase im M. gastrocnemius**

**Untrainierte Exon 2-4 Gruppe**



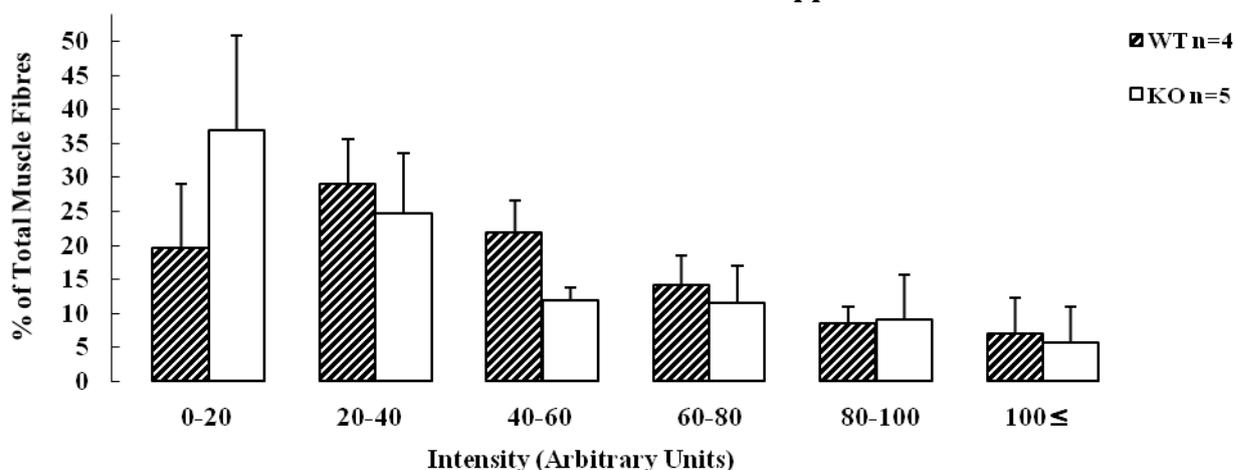
**Succinatdyhydrogenase im M. gastrocnemius**

**Trainierte Exon 2-4 Gruppe**



**Succinatdyhydrogenase im M. gastrocnemius**

**Trainierte Exon 2 Gruppe**



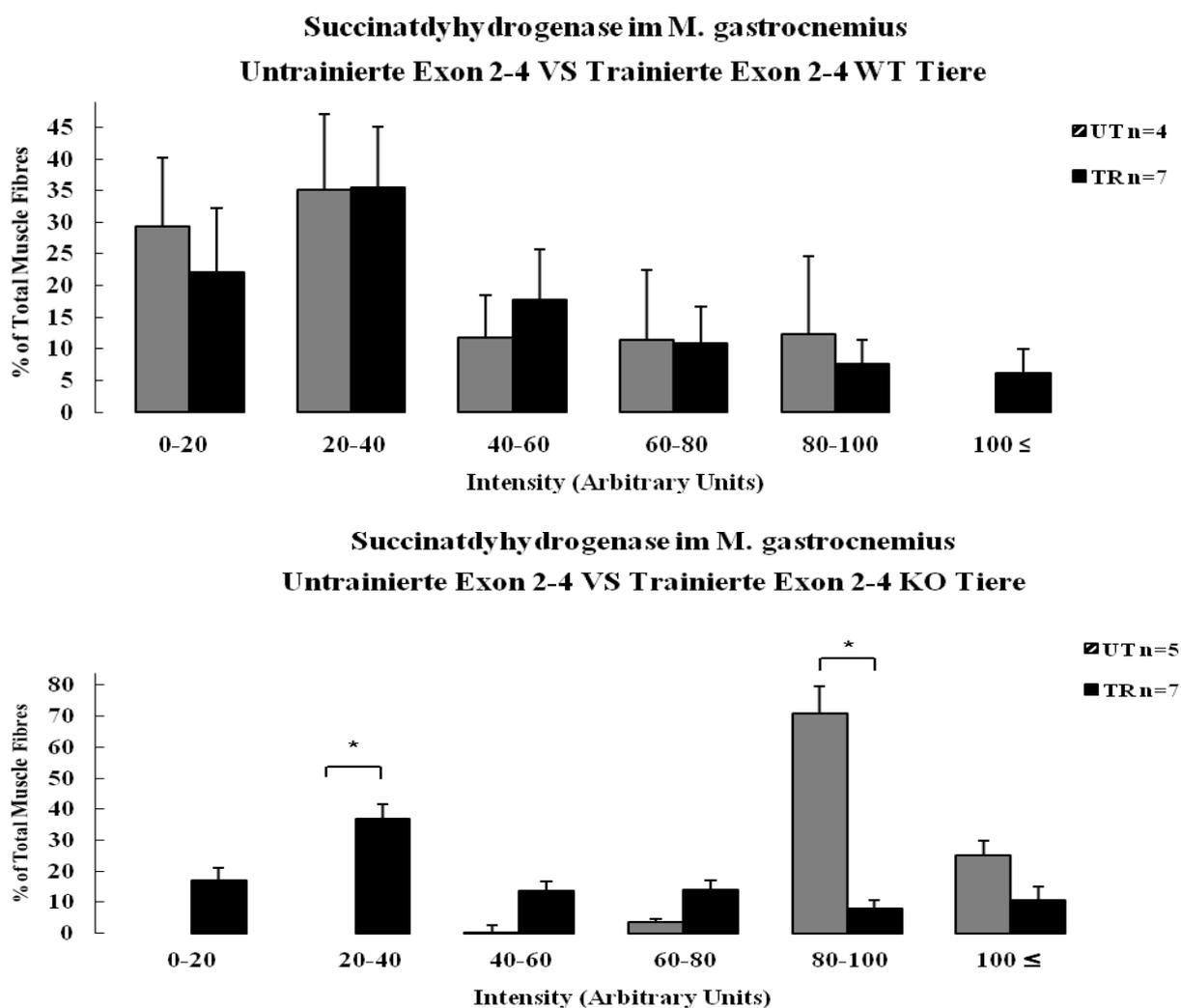


Abb. 12: Durchschnittliche Verteilung der densitometrisch gemessenen Succinatdehydrogenaseaktivität im M. gastrocnemius

Bei der Analyse der SDH-Aktivität im M. soleus (Abb. 13) konnte festgestellt werden, dass im untrainierten Zustand die Exon 2-4 KO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen einen größeren Anteil am Fasertyp-I aufweisen. Bei den Exon 2-4 KO Mäusen ließ sich eine große Abnahme der SDH-Aktivität in den Bereichen 0-20, 20-40 und 40-60 als Anzeichen für den Fasertyp-II beobachten. In den Bereichen 60-80 und 80-100 als Anzeichen für den Fasertyp-I zeigten KO Mäuse eine höhere SDH-Aktivität als WT Mäuse.

Im trainierten Zustand ließ sich kein Unterschied in der Verteilung der SDH-Aktivität zwischen den WT- und den KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe beobachten.

In der Analyse der Exon 2 Gruppe wiesen WT Mäuse eine höhere SDH-Aktivität im Bereich 0-20 und eine signifikant geringere SDH-Aktivität im Bereich 100-120 als KO Mäuse auf.

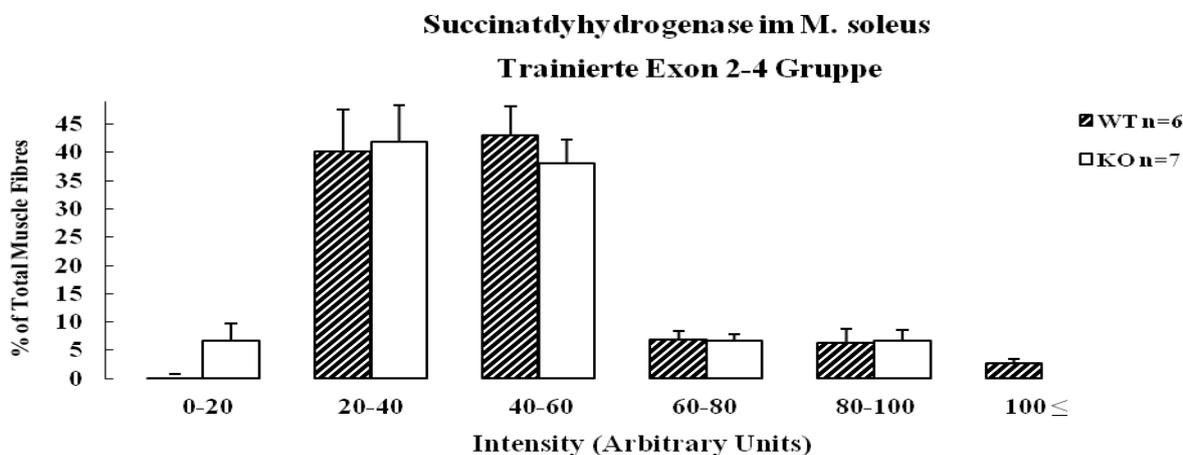
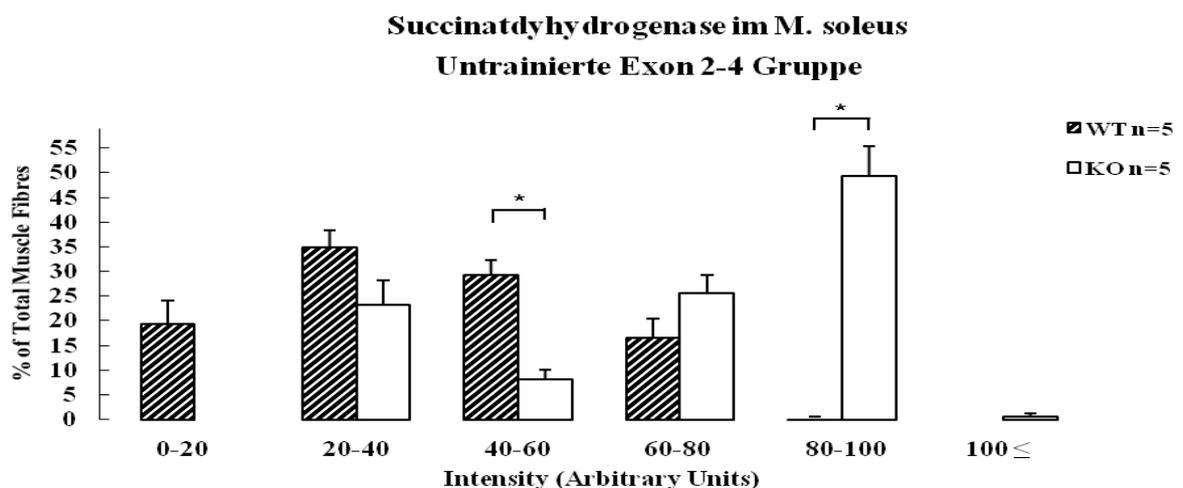
Beim Vergleich der SDH-Aktivität in den Bereichen zwischen 20-100 gab es kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Insgesamt waren in den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Fasertypenverteilung zwischen den WT- und den KO Mäusen zu erkennen.

Die WT Mäuse zeigten unter Trainingsbelastung eine leichte Umwandlung zum Fasertyp-I. Das körperliche Training führte zu einer Abnahme der SDH-Aktivität im Bereich 20-40 sowie zu einer signifikanten Zunahme der SDH-Aktivität im Bereich 80-100.

Die Analyse der SDH-Aktivität in Exon 2-4 KO Mäusen zeigte eine Verschiebung des Faserspektrums in Richtung des Muskelfasertyps-II. Im Vergleich zum untrainierten ließ sich im trainierten Zustand eine höhere Zunahme in den Bereichen 20-40 und 40-60 beobachten, wobei es zu einer signifikanten Abnahme in den Bereichen 60-80 und 80-100 kam.

Die Einteilung für verschiedene Grauwertstufen und die densitometrischen Messergebnisse für WT- und KO-Mäuse ist in Abb. 13 dargestellt.



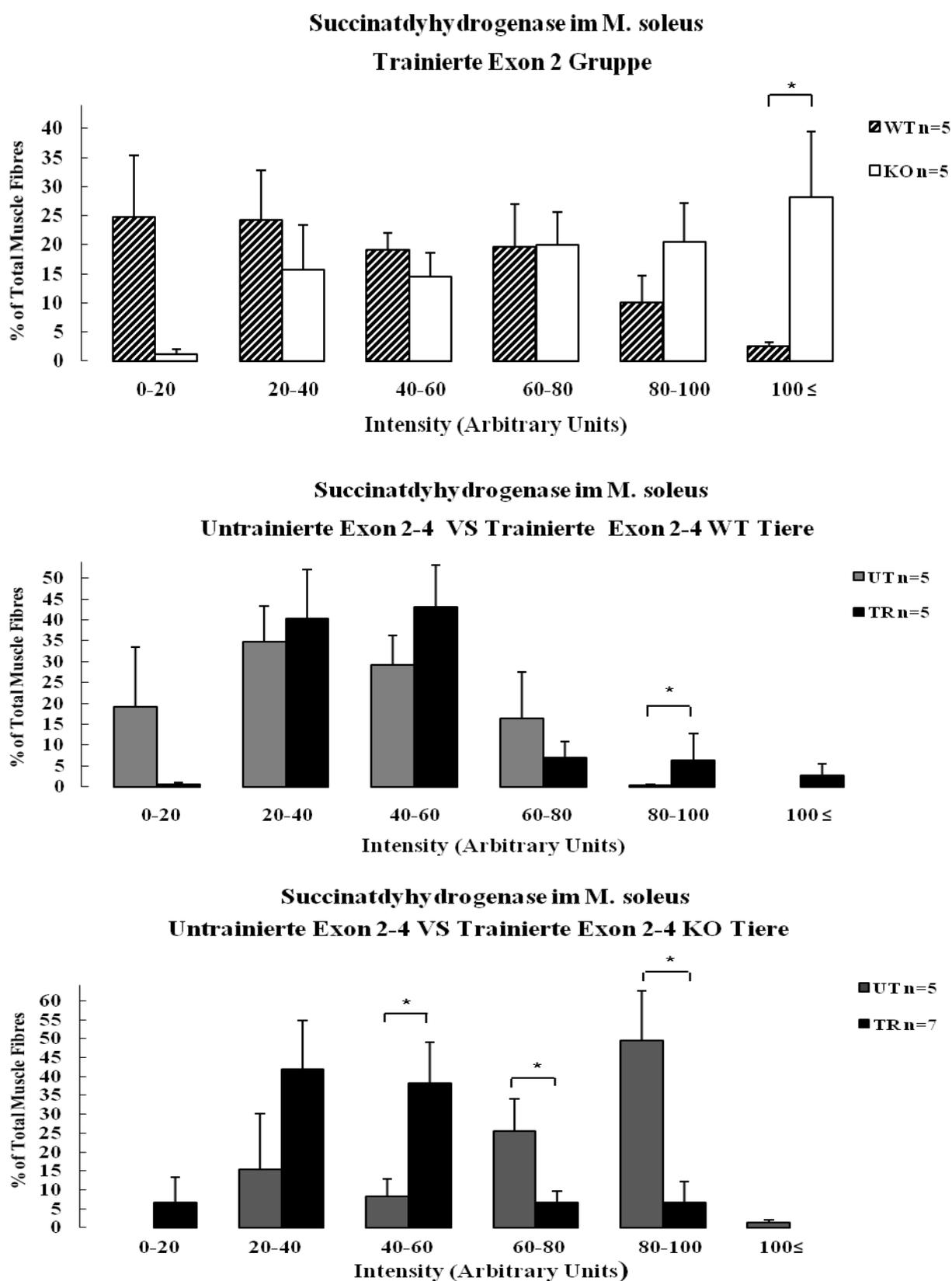


Abb. 13: Durchschnittliche Verteilung der densitometrischen Succinatdehydrogenase im M. soleus

Bei der Analyse der SDH-Aktivität im M. extensor digitorum longus (Abb. 14) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den untrainierten WT- und KO-Mäusen in den Bereichen 0-20 und 60-80. Insgesamt waren jedoch keine Unterschiede in der Fasertypenverteilung zwischen den WT- und den KO Mäusen im untrainierten Zustand zu erkennen. Dabei wiesen die WT und die KO Mäuse einen größeren Anteil am Muskelfasertyp-II auf.

Im trainierten Zustand ließ sich kein Unterschied in der Verteilung der SDH-Aktivität zwischen den WT- und den KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe beobachten.

In der Analyse der Exon 2 Gruppe wiesen WT Mäuse eine signifikant höhere SDH-Aktivität im Bereich 0-20 und eine signifikant geringere SDH-Aktivität im Bereich 40-60 als KO Mäuse auf. Beim Vergleich der SDH-Aktivität in den Bereichen 20-40, 60-80 und 80-100 gab es kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Insgesamt waren in den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Fasertypenverteilung zwischen den WT- und den KO Mäusen zu erkennen.

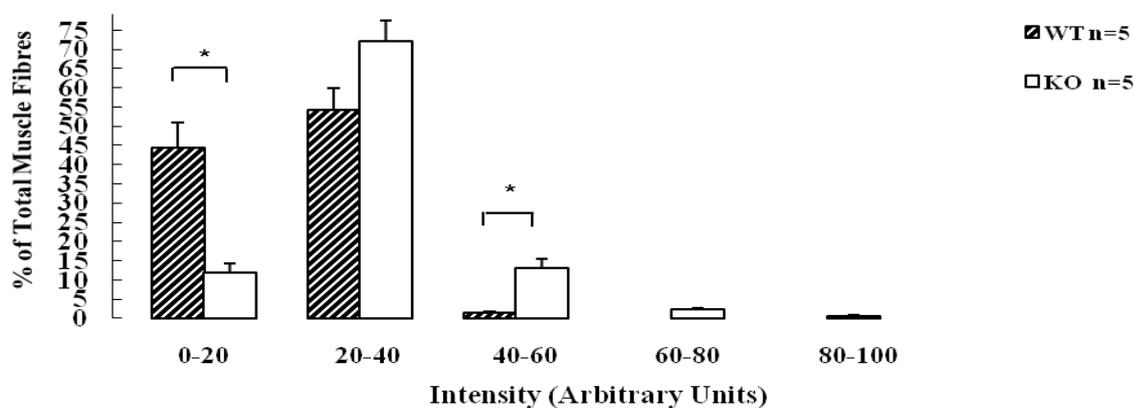
Die WT Mäuse zeigten unter Trainingsbelastung eine Umwandlung zum Fasertyp-I. Das körperliche Training führte zu einer Abnahme der SDH-Aktivität in den Bereichen 0-20 und 20-40 sowie zu einer signifikanten Zunahme der SDH-Aktivität in den Bereich 60-80 und 80-100.

Bei den Exon 2-4 KO Mäusen kam es zu einer trainingsbedingten Verschiebung des Faserspektrums in Richtung des Muskelfasertyps-I. Im Vergleich zum untrainierten ließ sich im trainierten Zustand eine geringere SDH-Aktivität in den Bereichen 0-20 und 20-40 beobachten, wobei sich eine signifikante Zunahme der SDH-Aktivität in den Bereichen 60-80 und 80-100 zeigte.

Die Einteilung für verschiedene Lichtdurchlässigkeiten und die durchschnittliche Verteilung der densitometrischen Messung der WT- und KO-Mäuse sind in Abb. 14 dargestellt.

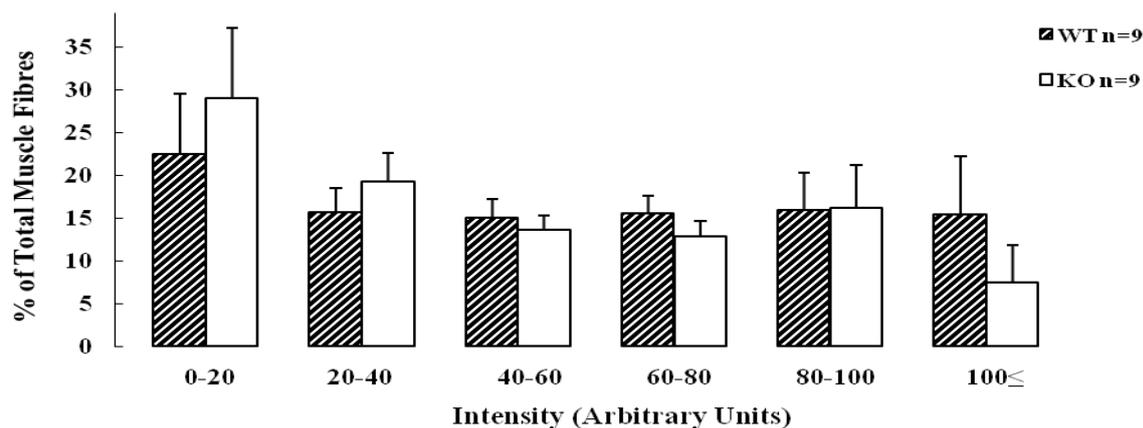
**Succinatdyhydrogenase im M. extensor digitorum longus**

**Untrainierte Exon 2-4 Gruppe**



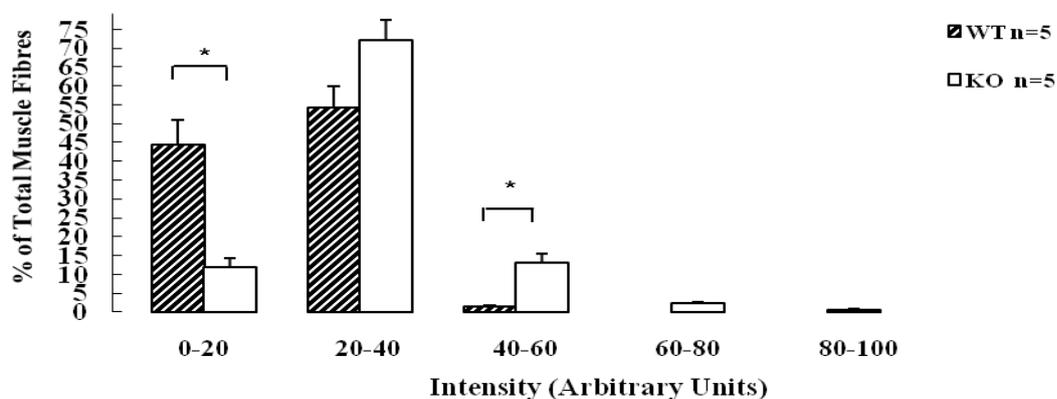
**Succinatdyhydrogenase im M. extensor digitorum longus**

**Trainierte Exon 2-4 Gruppe**



**Succinatdyhydrogenase im M. extensor digitorum longus**

**Untrainierte Exon 2 Gruppe**



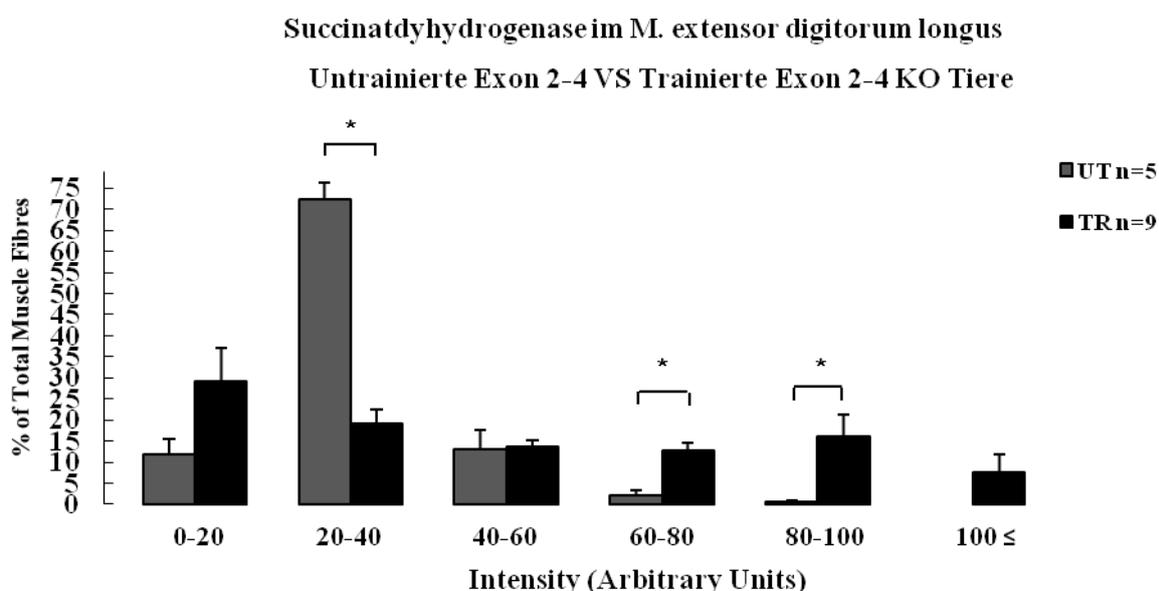
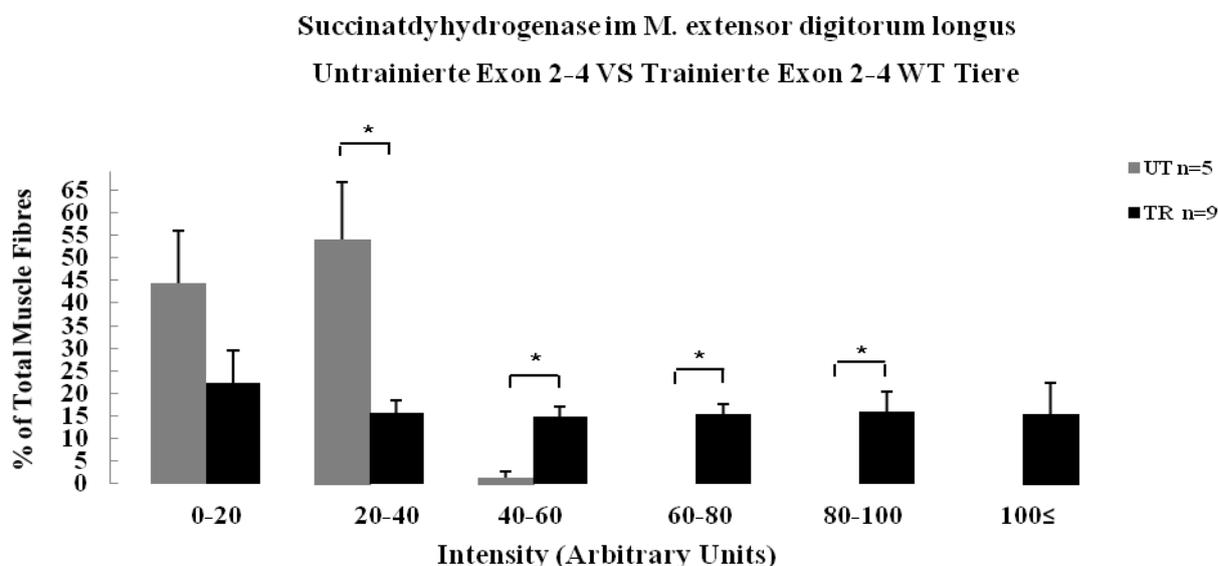


Abb. 14: Durchschnittliche Verteilung der densitometrisch gemessenen Succinatdehydrogenaseaktivität im M. extensor digitorum longus

Bei der Analyse der SDH-Aktivität im M. vastus lateralis (Abb. 15) zeigten sich Unterschiede zwischen den untrainierten WT- und KO-Mäusen in den Bereichen 0-20 und 40-60. Insgesamt waren jedoch keine Unterschiede in der Fasertypenverteilung zwischen WT und KO Mäusen zu erkennen, wobei die WT- und die KO Mäuse im untrainierten Zustand einen hohen Anteil des Muskelfasertyps-II aufwiesen.

Im trainierten Zustand ließen sich keine Unterschiede in der Verteilung der SDH-Aktivität zwischen den WT- und den KO-Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe beobachten. Die WT- und KO Mäusen wiesen eine erhöhte SDH-Aktivität im Bereich 20-40 und eine gleichzeitige Verringerung in den Bereichen zwischen 80 und  $100\leq$  auf.

Anhand dieser Verteilung der SDH-Aktivität war dabei ein hoher Anteil des Fasertyps-II zu erkennen.

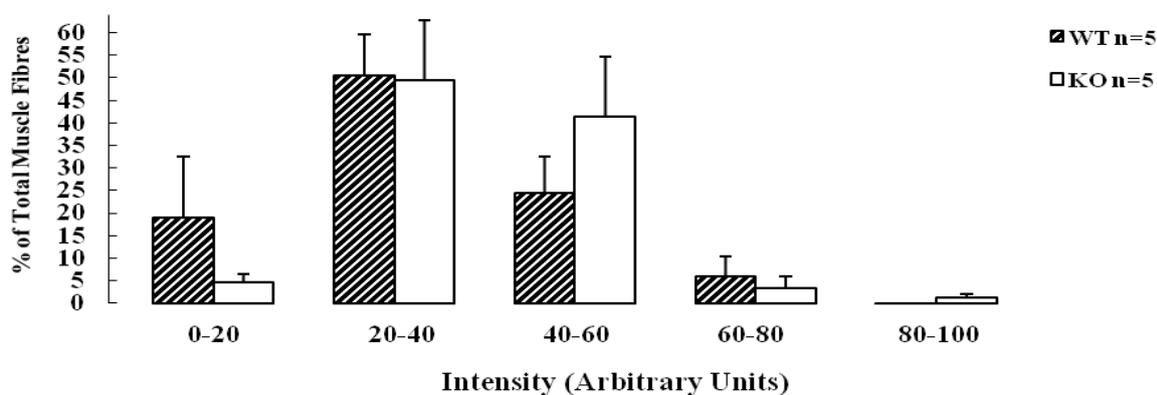
In der Exon 2 Gruppe konnte ebenfalls kein Unterschied in der Verteilung der SDH-Aktivität zwischen den WT- und den KO Mäusen beobachtet werden. Die WT- und KO Mäuse wiesen eine erhöhte SDH-Aktivität in den Bereichen 0-20 und 20-40 als Anzeichen für den Fasertyp-II und eine gleichzeitige Verringerung in den Bereichen zwischen 60 und  $100\leq$  als Anzeichen für den Fasertyp-I auf. Dabei ließ sich ein hoher Anteil des Fasertyps-II beobachten.

Die WT Mäuse zeigten keine trainingsinduzierte Verschiebung des Faserspektrums. Während ein körperliches Training einen Anstieg im Bereich 20-40 bewirkte, kam es zu einer Abnahme im Bereich 40-60. Dabei zeigte sich keine Veränderung der SDH-Aktivität in den Bereichen 80-100 und  $100\leq$ .

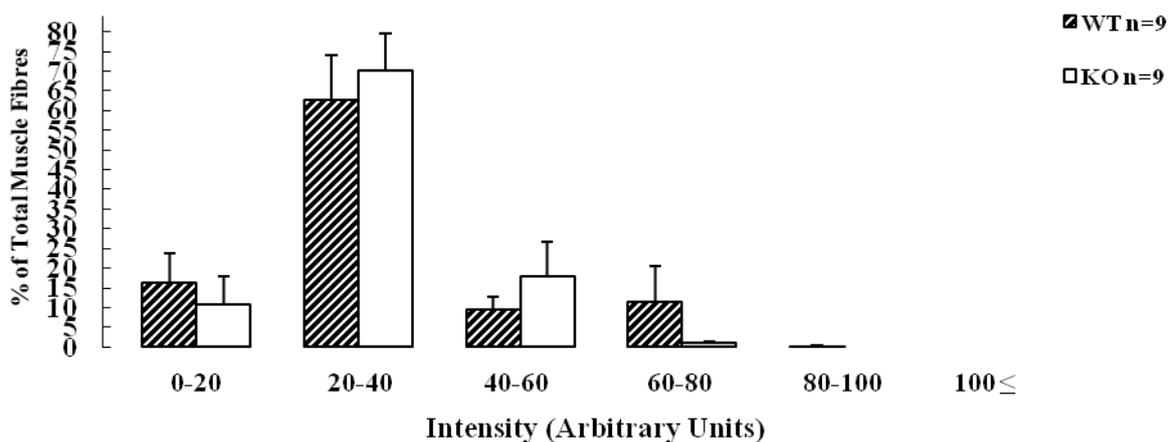
Ebenfalls ließ sich bei den Exon 2-4 KO Mäusen keine trainingsinduzierte Verschiebung des Faserspektrums beobachten. Das Training bewirkte eine Erhöhung der SDH-Aktivität im Bereich 20-40 und eine signifikante Abnahme im Bereich 80-100, während es keine Veränderung der SDH-Aktivität in den Bereichen 60-80 und  $100\leq$  kam.

Die Einteilung für verschiedene Grauwertstufen und die densitometrischen Messergebnisse für WT- und KO-Mäuse ist in Abb. 15 dargestellt.

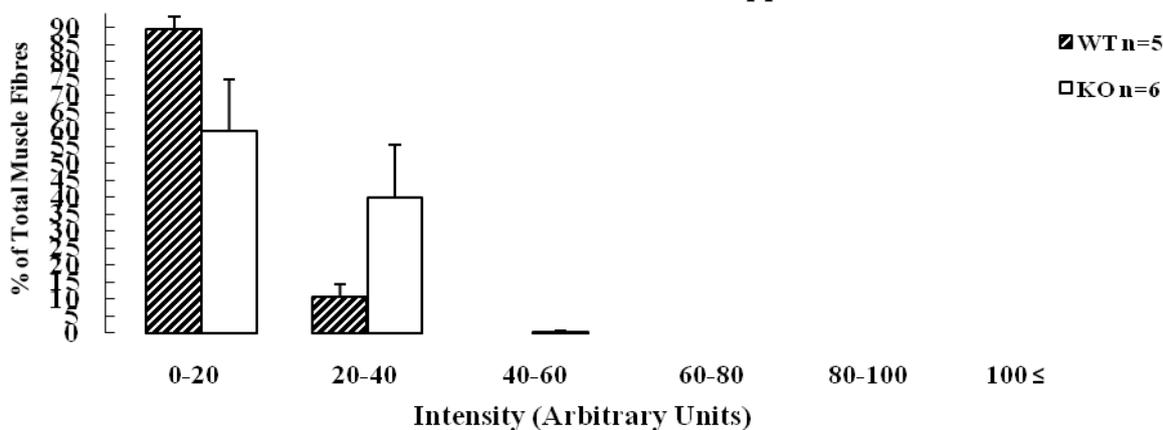
**Succinatdyhydrogenase im M. vastus lateralis**  
**Untrainierte Exon 2-4 Gruppe**



**Succinatdyhydrogenase im M. vastus lateralis**  
**Trainierte Exon 2-4 Gruppe**



**Succinatdyhydrogenase im M. vastus lateralis**  
**Trainierte Exon 2 Gruppe**



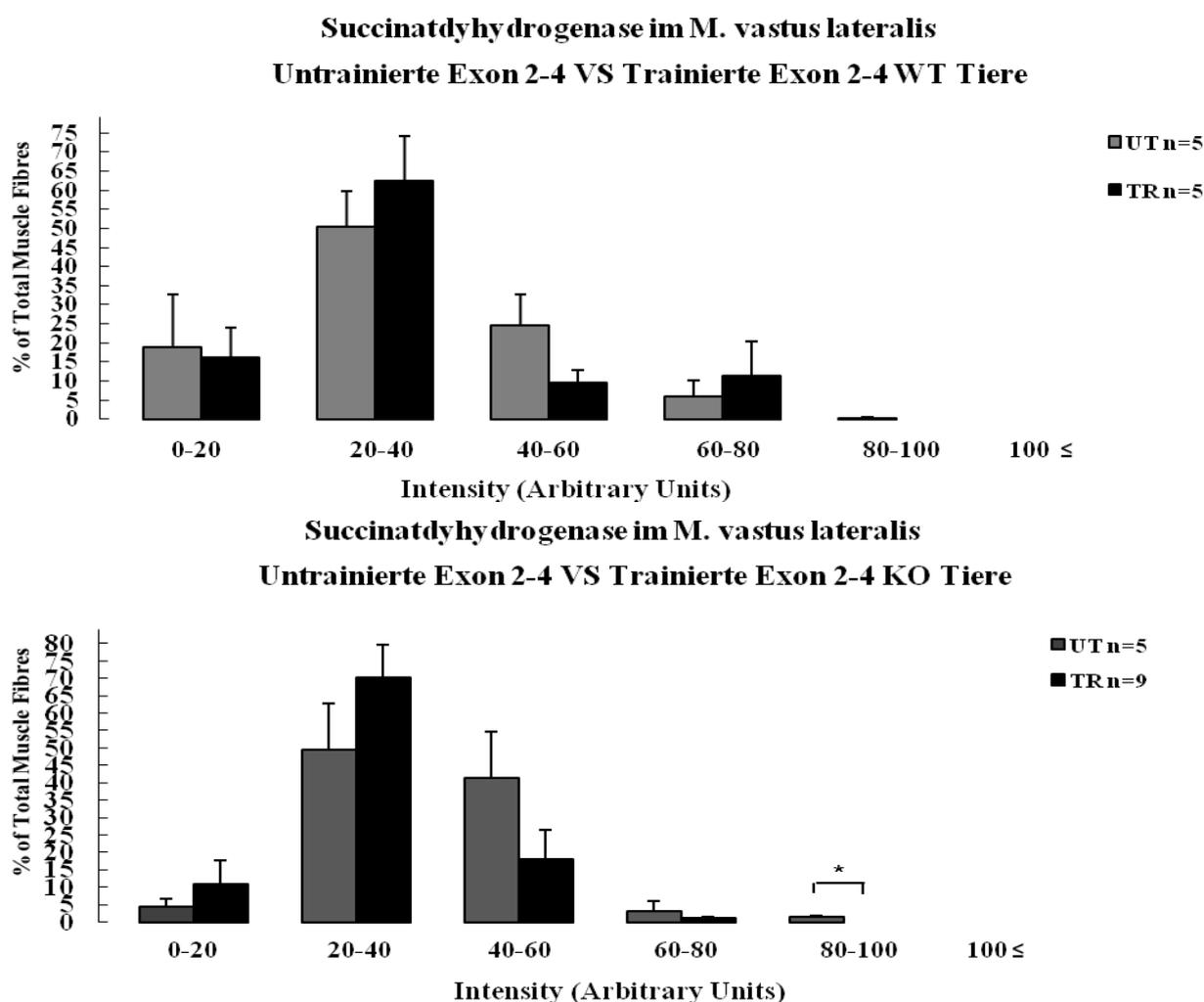


Abb. 15: Durchschnittliche Verteilung der densitometrischen Succinatdehydrogenase im M. vastus lateralis.

### 3.5 Aktivierung von Caspase-3

Die immunhistochemische Analyse im M. gastrocnemius (Abb. 16) zeigte keinen Unterschied in der basalen Aktivierung von Caspase-3 zwischen den WT- und den KO Tieren im untrainierten Zustand.

In der Exon 2-4 Gruppe ließ sich bei WT- und KO Mäusen im trainierten Zustand keine Veränderung der basalen Aktivierung von Caspase-3 feststellen. Des Weiteren konnte in der Exon 2 Gruppe beobachtet werden, dass ein vierwöchiges Training eine leichte Abnahme der basalen Aktivierung von Caspase-3 bei WT- und KO Mäusen bewirkt. Hier zeigten sich keine Unterschiede in der trainingsinduzierten Veränderung der basalen Aktivierung von Caspase-3 zwischen den WT- und den KO-Mäusen in allen Gruppen.

Bei der Analyse des *M. soleus* (Abb. 17) gab es keinen signifikanten Unterschied in der basalen Aktivierung von Caspase-3 zwischen den WT- und KO-Mäusen im untrainierten Zustand. Bei der Exon 2-4 Gruppe zeigte sich im trainierten Zustand keine Veränderung der basalen Aktivierung von Caspase-3 bei den WT- und den KO-Mäusen. Unter Trainingsbelastung kam es zu einer leichten Abnahme der basalen Aktivierung von Caspase-3 bei den WT- und den KO-Mäusen in der Exon 2 Gruppe. Hinsichtlich trainingsinduzierter Veränderungen der basalen Aktivierung von Caspase-3 ließen sich in allen Gruppen keine Unterschiede zwischen den WT- und den KO Mäusen feststellen.

Bei der basalen Caspase-3-Aktivierung des *M. extensor digitorum longus* (Abb. 18) bestand im untrainierten Zustand kein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und den KO-Mäusen. Bei der Exon 2-4 Gruppe zeigte sich bei den WT Mäusen im trainierten Zustand keine Veränderung der basalen Aktivierung von Caspase-3, wohingegen bei den Exon 2-4 KO Mäusen das Training einen leichten Anstieg der basalen Aktivierung von Caspase-3 bewirkte. In der Exon 2 Gruppe ließ sich eine leichte Verringerung der basalen Aktivierung von Caspase-3 bei den WT-Tieren im trainierten Zustand feststellen, während körperliches Training zu keiner Veränderung der basalen Aktivierung von Caspase-3 bei den Exon 2 KO Mäusen führte. Hier ließen sich in allen Gruppen keine Unterschiede in der trainingsinduzierten Veränderung der basalen Aktivierung von Caspase-3 zwischen den WT- und den KO-Mäusen beobachten.

Beim Vergleich der basalen Aktivierung von Caspase-3 im *M. vastus lateralis* (Abb. 19) zeigte sich kein Unterschied zwischen den WT- und den KO-Mäusen in der untrainierten Gruppe.

In der Exon 2-4 Gruppe zeigte sich unter Trainingsbelastung ebenfalls eine Reduktion der basalen Aktivierung von Caspase-3 bei den WT- und den KO Mäusen. Hierbei ließ sich auch eine signifikante Reduktion bei den Exon 2-4 WT Mäusen beobachten.

Im trainierten Zustand wiesen die WT- und KO Mäuse in der Exon 2 Gruppe eine Verringerung der basalen Aktivierung von Caspase-3 auf, wobei die Abnahme bei den Exon 2 WT Mäusen signifikant war. Insgesamt konnten in allen Gruppen kein Unterschied in der trainingsinduzierten Abnahme der basalen Aktivierung von Caspase-3 zwischen den WT- und den KO Mäusen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 13-16 dargestellt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

---

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
Type	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=9	4 KO n=6	5 WT n=5	6 KO n=3
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	11.3 ±3.9	11.4 ±6.3	10.5 ±5.5	7.2 ±2	6.6 ±2.8	6.5 ±2.6
p-Wert	p=1.0 (1 zu 2)	p=1.0 (2 zu 4)	p=1.0 (3 zu 1)	--	--	p=1.0 (6 zu 5)

Tab. 13: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius vastus lateralis. 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. gastrocnemius



### Die Caspase Expression im M. gastrocnemius

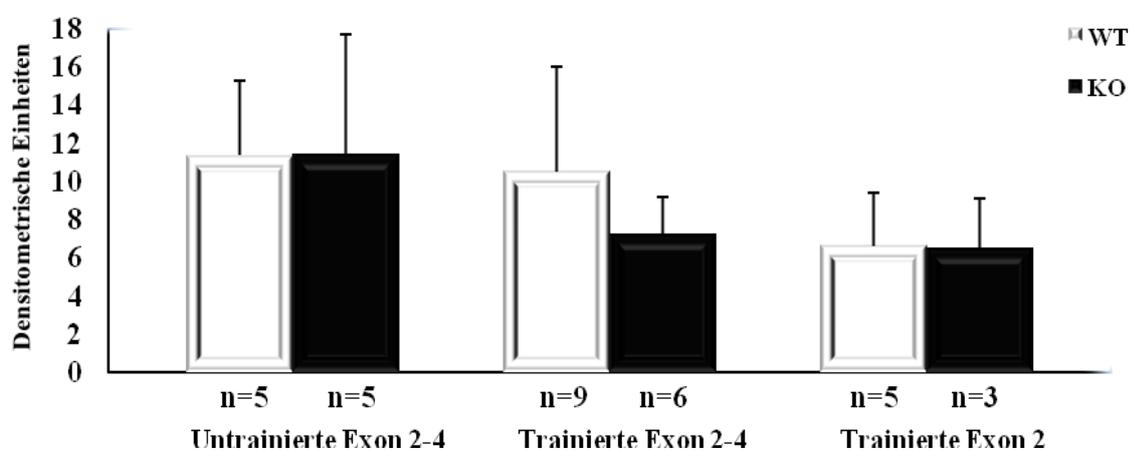


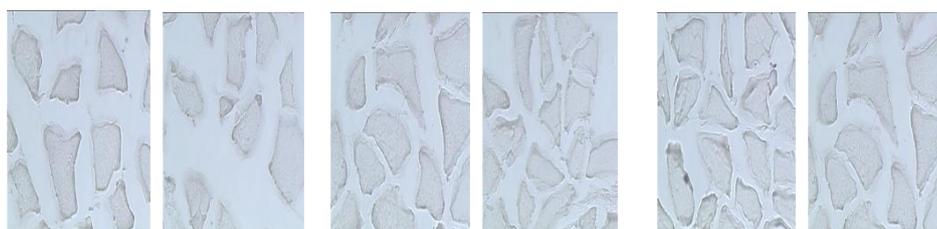
Abb. 16: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=4	4 KO n=5	5 WT n=3	6 KO n=6
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	23.8 ±15.9	12.4 ±4.4	28.9 ±9.9	16.9 ±7.9	9.1 ±5.6	6.9 ±1.3
p-Wert	p=0.79 (1 zu 2)	p=1.0 (2 zu 4)	p=1.0 (1 zu 3)	--	--	--

Tab. 14: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus.

1= WT (Untrainierte Exon2-4 Gruppe), 2= KO (Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT (Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO (Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. soleus



### Die Caspase Expression im M. soleus

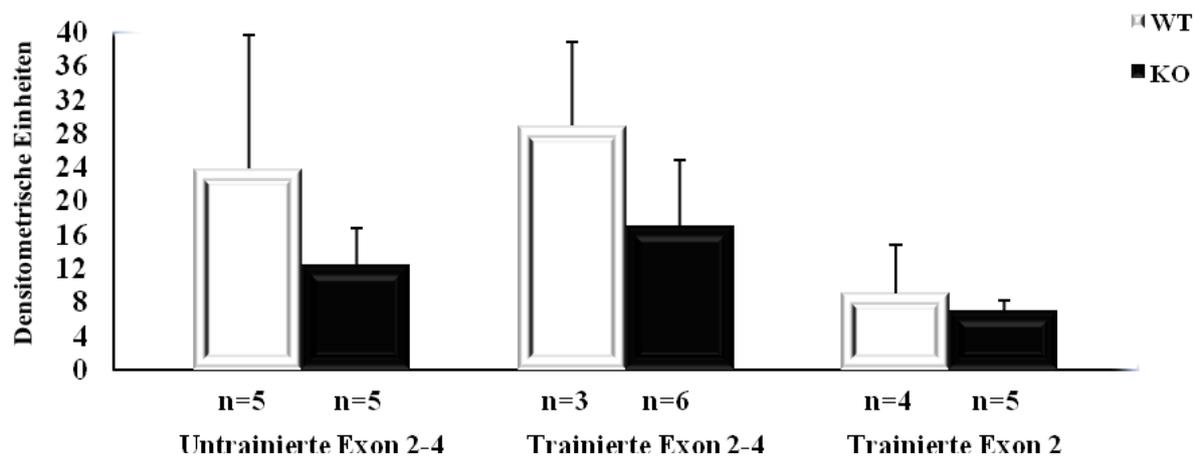
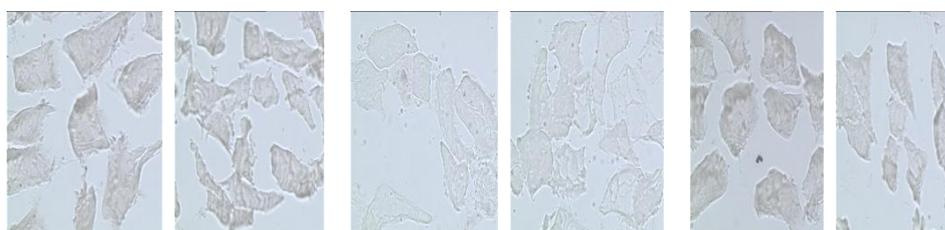


Abb. 17: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=4	3 WT n=3	4 KO n=4	5 WT n=5	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	12.1 ±6.8	9.3 ±2.9	12.4 ±2.8	17.2 ±6.1	6.8 ±2.4	8.7 ±6
p-Wert	p=1.0 (1 zu 2)	p=0.45 (2 zu 4)	p=1.0 (3 zu 1)	p=1.0 (4 zu 3)	--	p=1.0 (6 zu 5)

Tab. 15: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus. 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe),5= WT (Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO (Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. extensor digitorum longus



### Die Caspase Expression im M. extensor digitorum longus

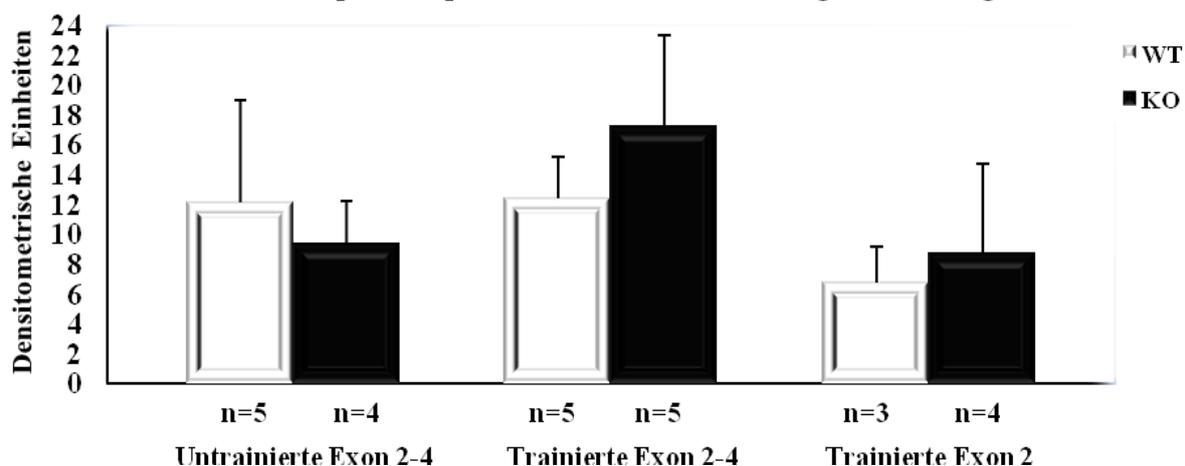
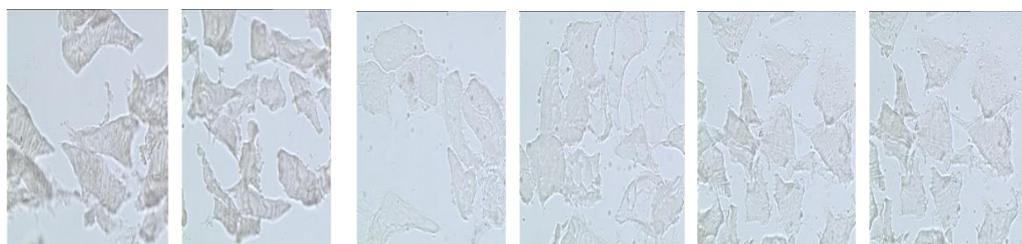


Abb. 18: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum longus

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
Type	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=8	4 KO n=8	5 WT n=4	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	24.6 ±7.3	19 ±9.5	12 ±7.2	9.7 ±1.7	5.7 ±2.8	8.9 ±3.9
p-Wert	p=0.014 (1 zu 2)	--	p=0.014 (3 zu 1)	--	--	--

Tab. 16: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. vastus lateralis. 1= WT (Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO (Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT (Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO (Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. vastus lateralis



### Die Caspase Expression im M. vastus lateralis

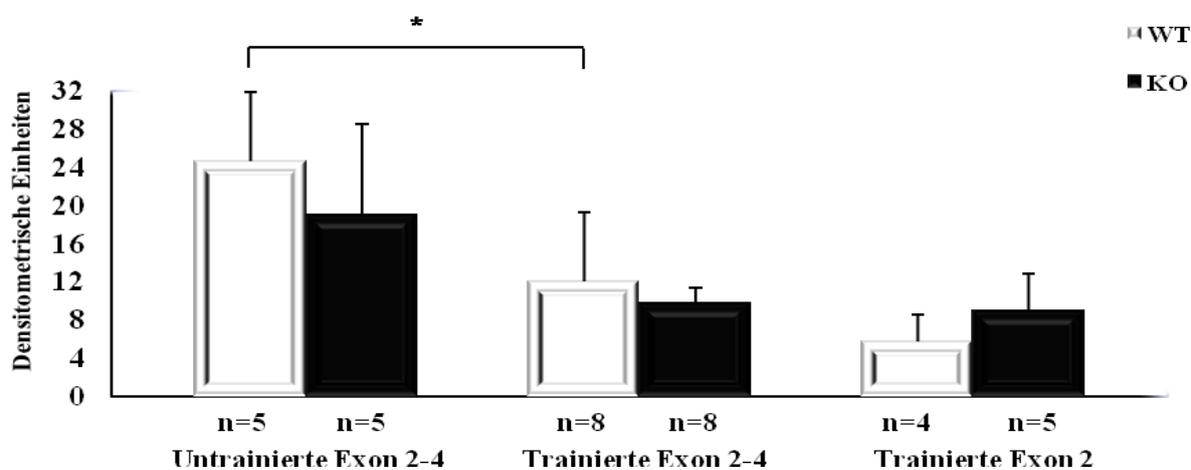


Abb. 19: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. vastus lateralis

### 3.6. Aktivierung von p-Akt(Thr308)

Die immunhistochemische Analyse im M. gastrocnemius (Abb. 20) zeigte keinen Unterschied in den basalen p-Akt (Thr 308)-Werten zwischen den WT- und den KO-Tieren im untrainierten Zustand.

Unter Trainingsbelastung ließ sich in der Exon 2-4 Gruppe eine Verringerung der basalen p-Akt-Werte bei den WT-Tieren feststellen, während körperliches Training zu keiner Veränderung der basalen p-Akt Werte bei den Exon 2-4 KO Tieren führte.

In der Exon 2 Gruppe konnte im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-Akt (Thr 308)-Werte zwischen den WT- und den KO Tieren festgestellt werden.

Insgesamt zeigte sich dabei kein Unterschied in der trainingsinduzierten Veränderung der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO-Mäusen.

Für basale p-Akt (Thr 308)-Werte im M. soleus (Abb. 21) gab es im untrainierten Zustand keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und den KO-Mäusen.

In der Exon 2-4 Gruppe konnte unter Trainingsbelastung eine leichte Reduktion der basalen p-Akt Werte bei den WT Mäusen festgestellt werden, während das Training keine Veränderung der basalen p-Akt Werte bei den Exon 2-4 KO Tieren bewirkte.

Im trainierten Zustand ließ sich kein Unterschied in der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO-Mäusen in der Exon 2 Gruppe beobachten.

Hinsichtlich trainingsinduzierter Veränderungen der basalen p-Akt Werte zeigte sich in allen Gruppen kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Bei der Analyse der basalen p-Akt (Thr 308)-Werte im M. extensor digitorum longus (Abb. 22) in der untrainierten Gruppe gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und den KO-Mäusen. Die basalen p-Akt Werte waren bei den WT-Mäusen höher.

Unter Trainingsbelastung kam es zu einer signifikanten Abnahme der basalen p-Akt Werte bei den WT- und den KO-Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe.

Bei der Exon 2 Gruppe zeigte sich im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO-Mäusen. Hier ließ sich in allen Gruppen kein Unterschied in der trainingsinduzierten Abnahme der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO Mäusen beobachten.

Für basale p-Akt (Thr 308)-Werte im M. vastus lateralis (Abb. 23) gab es in der untrainierten Gruppe keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen.

In der Exon 2-4 Gruppe zeigte sich unter Trainingsbelastung keine Veränderung der basalen p-Akt Werte bei den WT- und den KO Mäusen. In der Exon 2 Gruppe ließ sich im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO Mäusen beobachten.

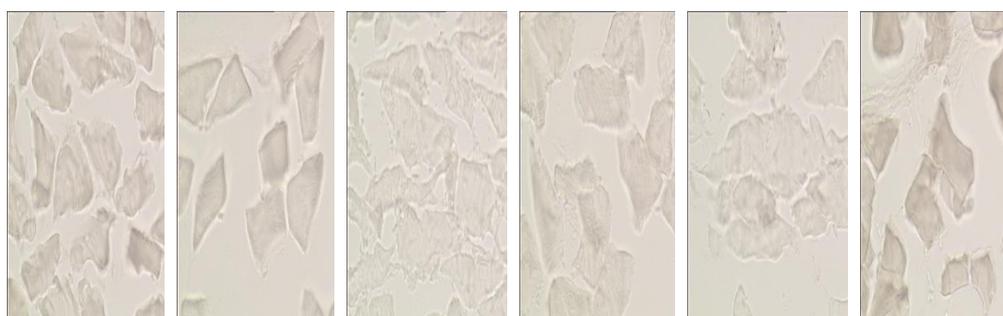
Insgesamt konnte in allen Gruppen kein Unterschied in den trainingsinduzierten Veränderungen der basalen p-Akt (Thr 308)-Werte zwischen den WT- und den KO Mäusen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 17–20 dargestellt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=6	4 KO n=8	5 WT n=4	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	21.9 ±6.2	20.4 ±3.9	13.3 ±9.1	24.5 ±23.4	6.5 ±2.4	10 ±5.6
p-Wert	p=0.52 (1 zu 2)	p=0.76 (2 zu 4)	p=1.0 (3 zu 4)	--	p=1.0 (5 zu 6)	--

Tab. 17: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius. 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. gastrocnemius



Die p-AKT (Thr308) Expression im M. gastrocnemius

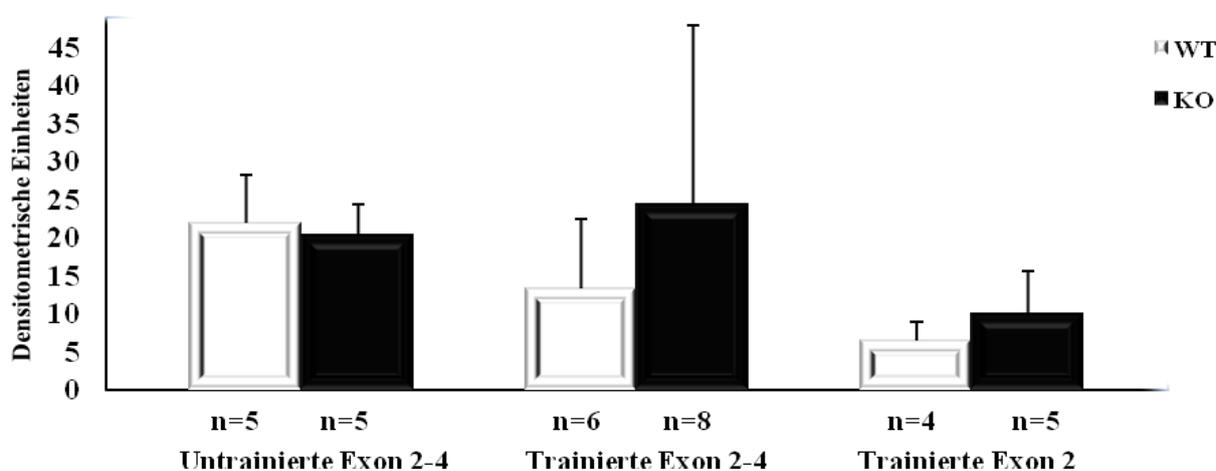


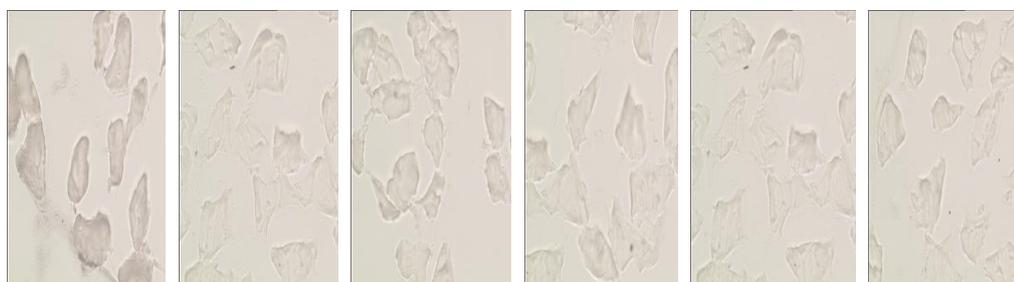
Abb. 20: p-Akt Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
Type	1 WT n=4	2 KO n=5	3 WT n=5	4 KO n=7	5 WT n=3	6 KO n=4
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	18.9 ±10	10.3 ±5.7	8.9 ±5.1	8.4 ±4.8	13.8 ±7.1	9.6 ±2.4
p-Wert	p=0.66 (1 zu 2)	p=1.0 (2 zu 4)	p=0.31 (3 zu 1)	p=1.0 (4 zu 3)	--	--

Tab. 18: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus.

1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. soleus



Die p-Akt (Thr308) Expression im M. soleus

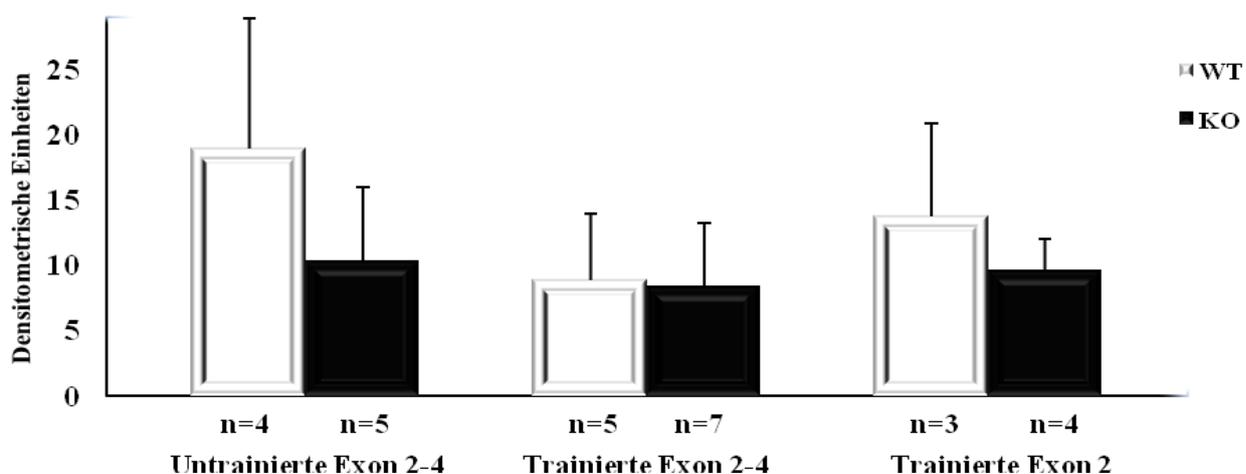


Abb. 21: p-Akt (Thr308)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=5	4 KO n=6	5 WT n=5	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	22.7 ±6.2	17.3 ±4.4	6.7 ±2.4	4 ±1.2	10.1 ±4.1	7.8 ±2.7
p-Wert	p=0.00 (1 zu 2)	p=0.00 (2 zu 4)	p=0.00 (3 zu 1)	--	--	--

Tab. 19: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2=KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3=WT(Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Exon 2 Gruppe), 6= KO(Exon 2 Gruppe).

### M. extensor digitorum longus



### Die p-AKT(Thr308) Expression im M. extensor digitorum longus

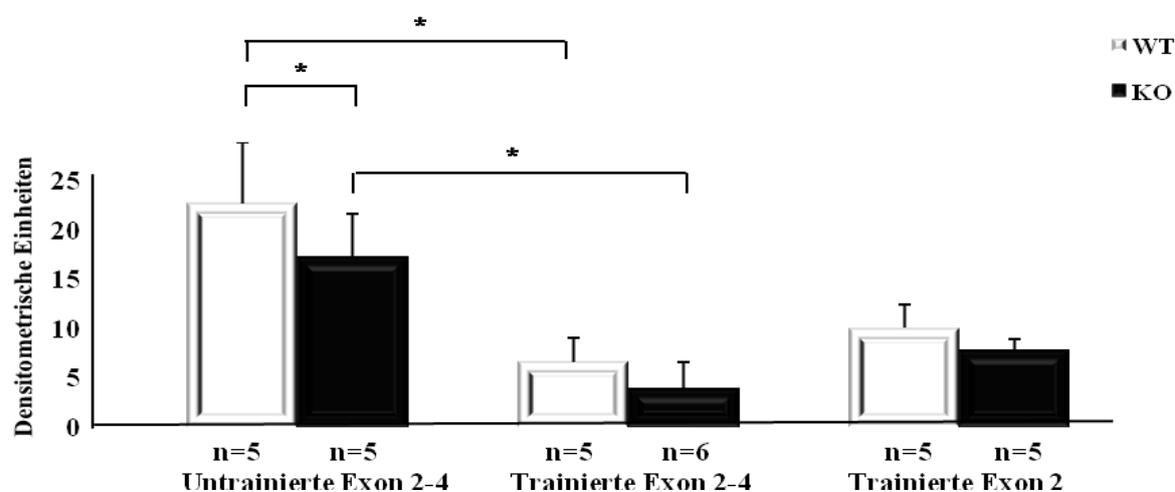
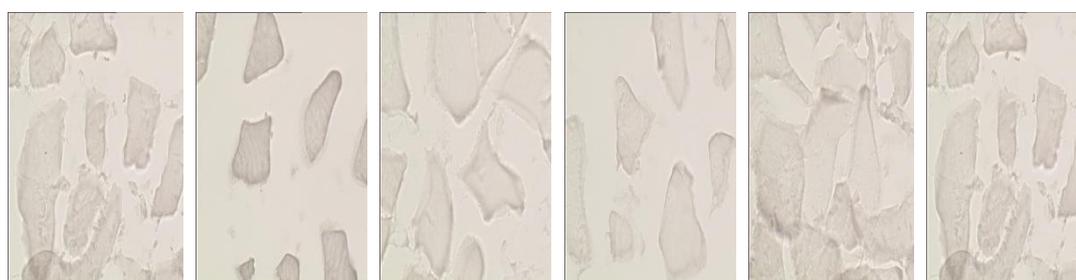


Abb. 22: p-Akt(thr308)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum longus

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=6	4 KO n=7	5 WT n=5	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	14.1 ±9.8	19.9 ±4.1	15.2 ±4.1	18.4 ±5.7	11.7 ±6.6	12.5 ±5.1
p-Wert	p=1.0 (1 zu 2)	p=1.0 (2 zu 4)	p=1.0 (3 zu 1)	p=1.0 (3 zu 4)	--	p=1.0 (6 zu 5)

Tab. 20: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert vom M. vastus lateralis. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2=KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3=WT(Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Exon 2 Gruppe), 6= KO(Exon 2 Gruppe).

### M. vastus lateralis



Die p-Akt(Thr308) Expression im M. vastus lateralis

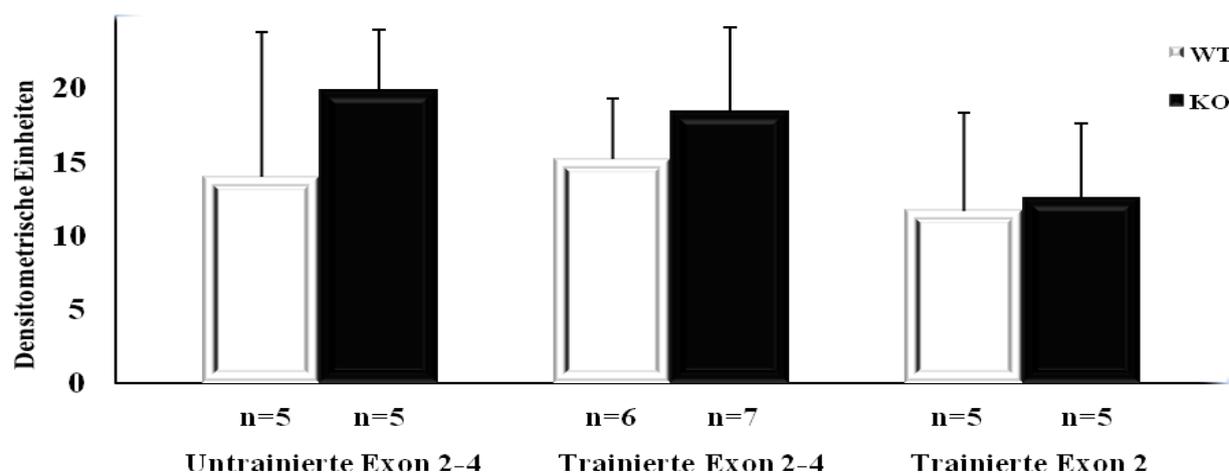


Abb.23: p-Akt(Thr308)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. vastus Lateralis

### 3.7. Aktivierung von p-Akt(Ser473)

Die immunhistochemische Analyse im M. gastrocnemius (Abb. 24) zeigte im untrainierten Zustand keinen Unterschied in den basalen p-Akt (Ser 473)-Werten zwischen den WT- und den KO Tieren.

Unter Trainingsbelastung konnte in der Exon 2-4 Gruppe eine Verringerung der basalen p-Akt Werte festgestellt werden, wobei kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Tieren bestand. In der Exon 2-Gruppe ließ sich im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-Akt (Ser 473)-Werte zwischen den WT- und den KO Tieren beobachten.

Insgesamt ließ sich kein Unterschied in der trainingsinduzierten Abnahme der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO-Mäusen beobachten.

Für basale p-Akt (Ser 473)-Werte im M. soleus (Abb. 25) gab es im untrainierten Zustand einen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen. Die basalen p-Akt Werte waren bei den WT-Mäusen höher.

In der Exon 2-4 Gruppe konnte unter Trainingsbelastung eine Reduktion der basalen p-Akt Werte sowohl bei den WT- als auch bei den KO Mäusen festgestellt werden. Bei den WT Mäusen war dabei die Reduktion signifikant. Im trainierten Zustand ließ sich kein Unterschied in der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO Mäusen in der Exon 2 Gruppe beobachten.

Für diese trainingsinduzierte Abnahme der basalen p-Akt Werte konnte in allen Gruppen kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen festgestellt werden.

Beim Vergleich der basalen p-Akt (Ser 473)-Werte im M. extensor digitorum longus (Abb. 26) zeigte sich in der untrainierten Gruppe kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen. Unter Trainingsbelastung kam es ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der basalen p-Akt (Ser 473)-Werte bei den WT- und den KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe.

Bei der Exon 2 Gruppe zeigte sich im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Hier ließ sich in allen Gruppen kein Unterschied in der trainingsinduzierten Abnahme der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO-Mäusen beobachten.

Für basale p-Akt (ser473)-Werte im M. vastus lateralis (Abb. 27) gab es in der untrainierten Gruppe einen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen. Die basalen p-Akt Werte waren bei den WT-Mäusen höher.

Bei der Exon 2-4 Gruppe zeigte sich unter Trainingsbelastung eine Reduktion der basalen p-Akt Werte bei den WT- und den KO Mäusen. Bei den WT Mäusen war dabei die Reduktion signifikant.

Bei der Exon 2 Gruppe zeigte sich im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Insgesamt konnte in allen Gruppen kein Unterschied in der trainingsinduzierten Abnahme der basalen p-Akt Werte zwischen den WT- und den KO Mäusen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sind in Tabellen 21-24 dargestellt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
Type	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=10	4 KO n=7	5 WT n=3	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	15.6 ±4.8	15.7 ±3	12.5 ±6.1	8.5 ±3.1	7.7 ±1.4	4.9 ±0.9
p=Wert	p=1.0 (1 zu 2)	p=0.11 (2 zu 4)	p=1.0 (3 zu 1)	p=0.98 (4 zu 3)	p=1.0 (5 zu 3)	p=1.0 (6 zu 5)

Tab. 21: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2=KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. gastrocnemius



### Die p-Akt (Ser 473) Expression im M. gastrocnemius

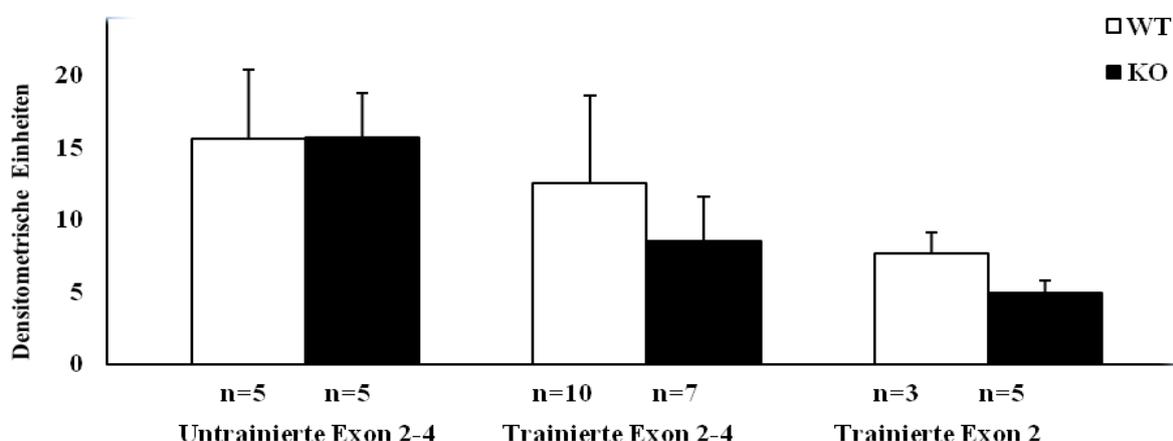
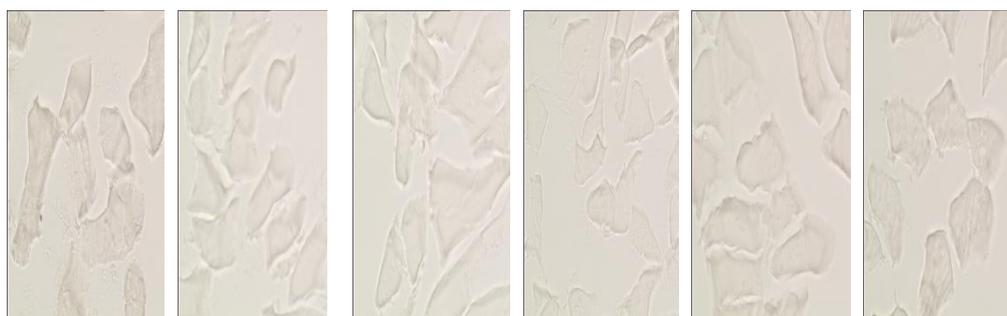


Abb. 24:p-Akt(ser473)Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=5	4 KO n=7	5 WT n=4	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	27.1 ±8.2	14.4 ±2.8	13.4 ±3.3	11.7 ±3.4	7.8 ±1.8	5.4 ±1.3
p-Wert	p=0.001 (1 zu 2)	p=1.0 (2 zu 4)	p=0.00 (3 zu 1)	--	p=1.0 (5 zu 6)	p=1.0 (6 zu 5)

Tab. 22: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus  
 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. soleus



### Die p-Akt(Ser 473) Expression im M. soleus

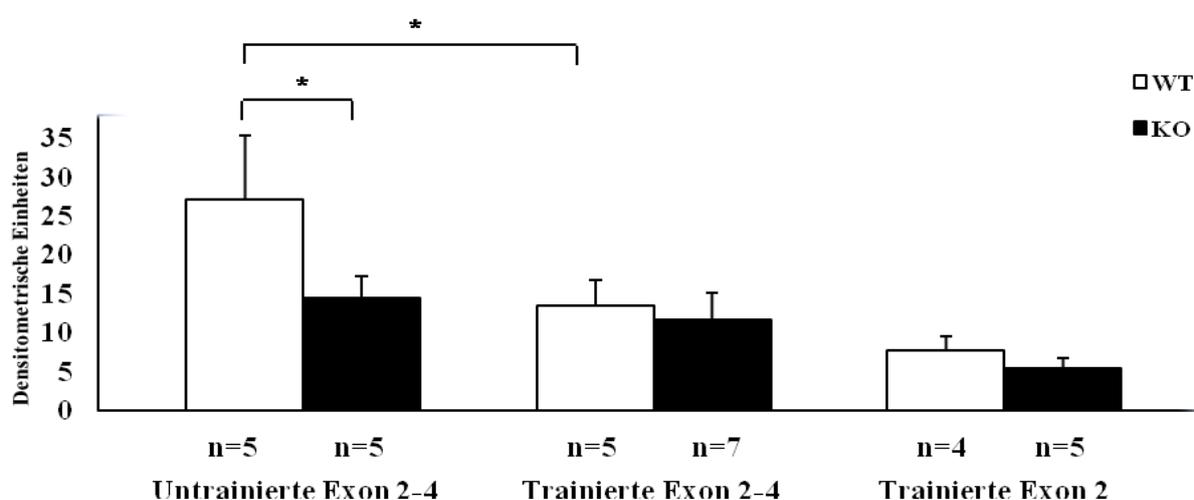


Abb. 25:p-Akt(ser473)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
Type	1 WT n=5	2 KO n=3	3 WT n=9	4 KO n=7	5 WT n=5	6 KO n=4
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	18.8 ±10.3	19.3 ±5.5	6.7 ±3.2	5.5 ±1.5	5.8 ±2.3	4.9 ±0.9
p-Wert	p=0.001 (1 zu 3)	p=0.004 (2 zu 4)	p=0.001 (3 zu 1)	p=0.004 (4 zu 2)	--	--

Tab. 23: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2=KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. extensor digitorum longus



Die p-Akt (Ser 473) Expression im M. extensor digitorum longus

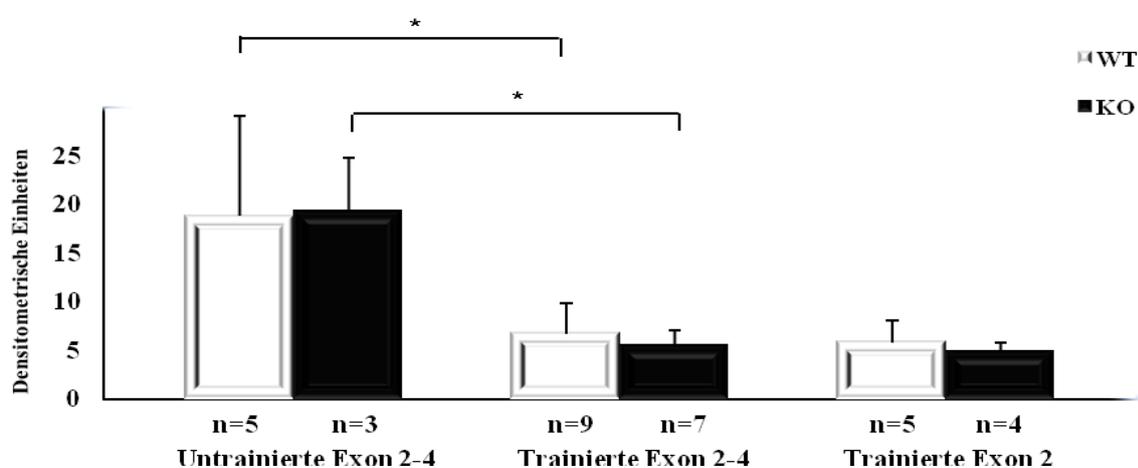
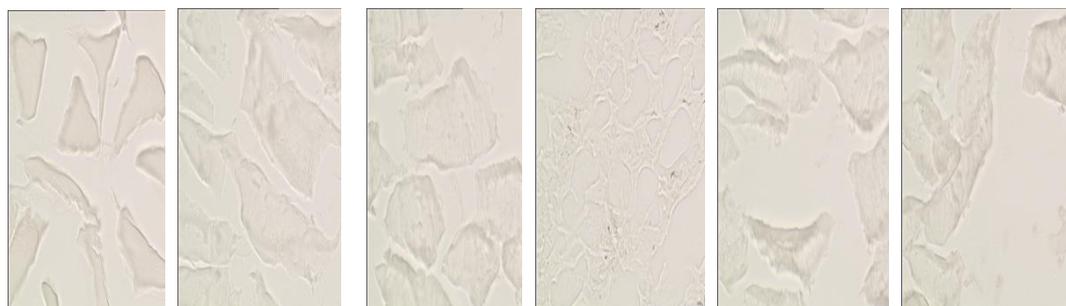


Abb. 26: p-Akt(ser473)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum longus

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=7	4 KO n=7	5 WT n=5	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	17.4 ±6.2	10.2 ±4.3	7 ±3	6.6 ±1.9	7.7 ±1.4	5 ±2.3
p=Wert	p=0.00 (1 zu 3)	p=0.04 (2 zu 1)	p=0.00 (3 zu 1)	p=1.0 (4 zu 3)	--	p=1.0 (6 zu 5)

Tab. 24: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. vastus lateralis. 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. vastus lateralis



Die p-Akt (Ser 473) Expression im M. vastus lateralis

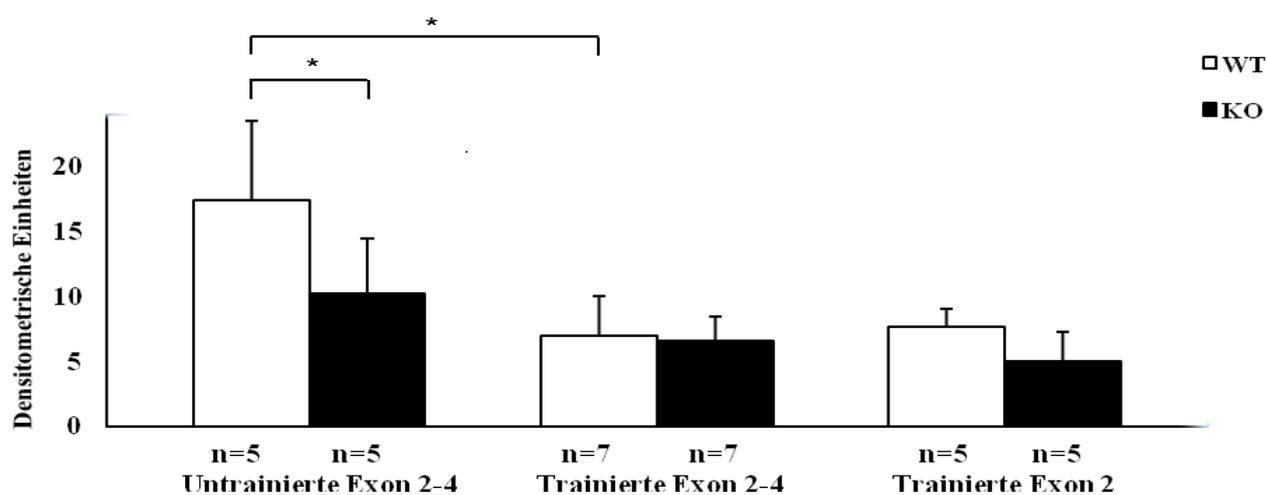


Abb.27:p-Akt(ser473)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M.vastus lateralis

### 3.8 Aktivierung von p-ERK

Die immunhistochemische Analyse im M. gastrocnemius (Abb. 28) zeigte im untrainierten Zustand keinen Unterschied in der basalen Aktivierung von p-ERK zwischen den WT- und den KO Tieren. Unter Trainingsbelastung kam es zu einer signifikanten Zunahme der basalen Aktivierung von p-ERK bei den WT- und den KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe.

Bei der Exon 2-4 Gruppe zeigte sich im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen Aktivierung von p-ERK zwischen den WT- und den KO Mäusen. Für die trainingsinduzierte Zunahme der basalen Aktivierung von p-ERK konnte in allen Gruppen kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen festgestellt werden.

Beim Vergleich der basalen Aktivierung von p-ERK im M. soleus (Abb. 29) zeigte sich in der untrainierten Gruppe kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Unter Trainingsbelastung wiesen die WT- und KO Mäuse in der Exon 2-4 Gruppe einen signifikanten Anstieg der basalen p-ERK Aktivierung auf

In der Exon 2 Gruppe konnte im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-ERK Aktivierung zwischen den WT- und den KO-Mäusen festgestellt werden.

Hierbei ließ sich in allen Gruppen kein Unterschied in der trainingsinduzierten Zunahme der basalen Aktivierung von p-ERK zwischen den WT- und den KO Mäusen beobachten.

Für basale Aktivierung von p-ERK im M. extensor digitorum longus (Abb. 30) gab es in der untrainierten Gruppe keinen signifikanten Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Nach einem vierwöchigen Training ließ sich eine Zunahme der basalen p-ERK Aktivierung bei den WT- und den KO Mäusen in der Exon 2-4 Gruppe beobachten.

Bei der Exon 2 Gruppe zeigte sich im trainierten Zustand kein Unterschied in der basalen p-ERK Aktivierung zwischen den WT- und den KO Mäusen.

Insgesamt ließ sich in allen Gruppen kein Unterschied in der trainingsinduzierten Zunahme der basalen p-ERK Aktivierung zwischen den WT- und den KO Mäusen feststellen.

Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 25 und 27 dargestellt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=8	4 KO n=7	5 WT n=4	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	19.7 ±2.3	17.3 ±1.1	85.2 ±10.8	63.7 ±20.8	61.2 ±14.7	59.6 ±16.3
p-Wert	p=0.00 (1 zu 3)	p=0.00 (2 zu 4)	p=0.00 (3 zu 1)	p=0.00 (4 zu 2)	--	--

Tab. 25: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius. 1= WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT(Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO(Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. gastrocnemius



Die p-ERK Expression im M. gastrocnemius

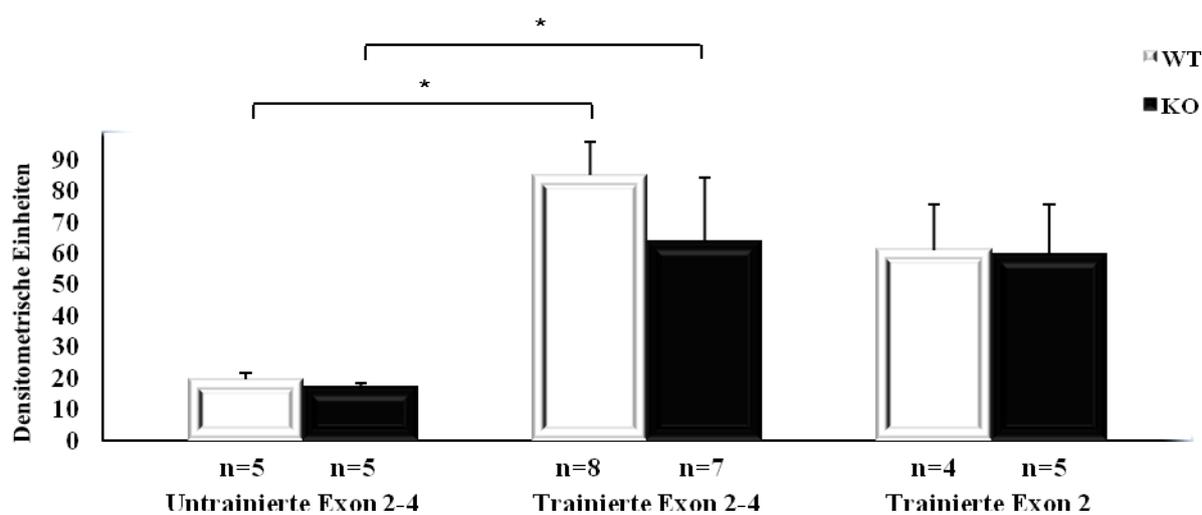


Abb. 28: p-ERK Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=5	3 WT n=4	4 KO n=3	5 WT n=4	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	20.1 ±2.7	16.4 ±2.3	84.9 ±23.2	77 ±44.3	33.2 ±20.9	28.4 ±22.2
p-Wert	p=0.003 (1 zu 3)	p=0.012 (2 zu 4)	p=0.003 (3 zu 1)	p=0.012 (4 zu 2)	--	--

Tab. 26: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus.

1= WT (Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2= KO (Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4= KO (Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5= WT (Trainierte Exon 2 Gruppe), 6= KO (Trainierte Exon 2 Gruppe).

### M. soleus



### Die p-ERK Expression im M. soleus

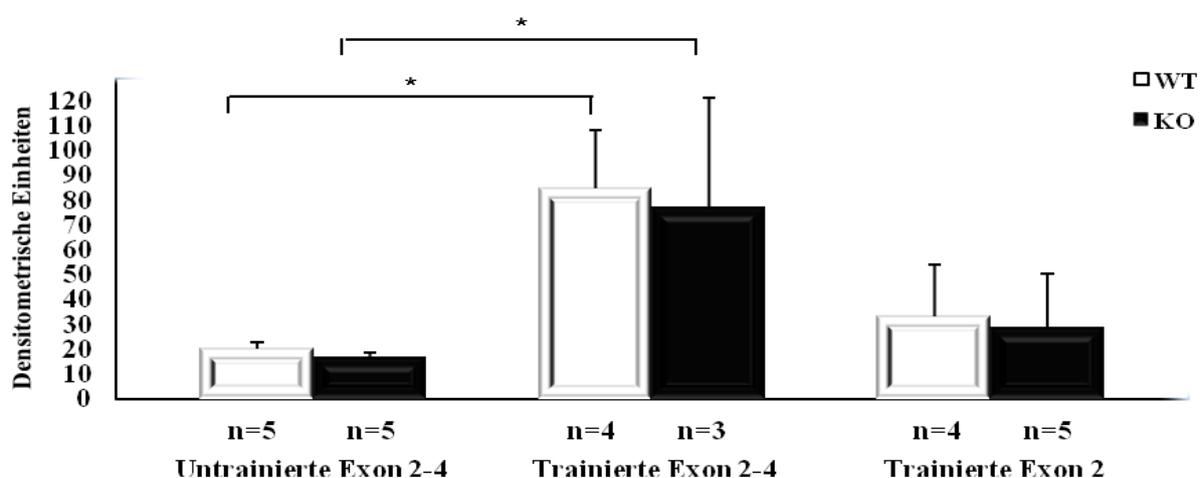


Abb. 29: p-ERK Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus

Gruppe	Untrainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2-4 Gruppe		Trainierte Exon 2 Gruppe	
	1 WT n=5	2 KO n=4	3 WT n=8	4 KO n=7	5 WT n=5	6 KO n=5
Densitometrische Einheiten (MW/SD)	20.4 ±2.8	13.4 ±1.9	63.5 ±24.6	50.5 ±21	39.7 ±12.1	46.1 ±26.6
p-Wert	p=0.008 (1 zu 3)	--	p=0.008 (3 zu 1)	--	--	--

Tab. 27: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus. 1=WT(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 2=KO(Untrainierte Exon 2-4 Gruppe), 3= WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 4=KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 5=WT(Trainierte Exon 2-4 Gruppe), 6=KO(Trainierte Exon 2-4 Gruppe).

### M. extensor digitorum longus



### Die p-ERK Expression im M. extensor digitorum longus

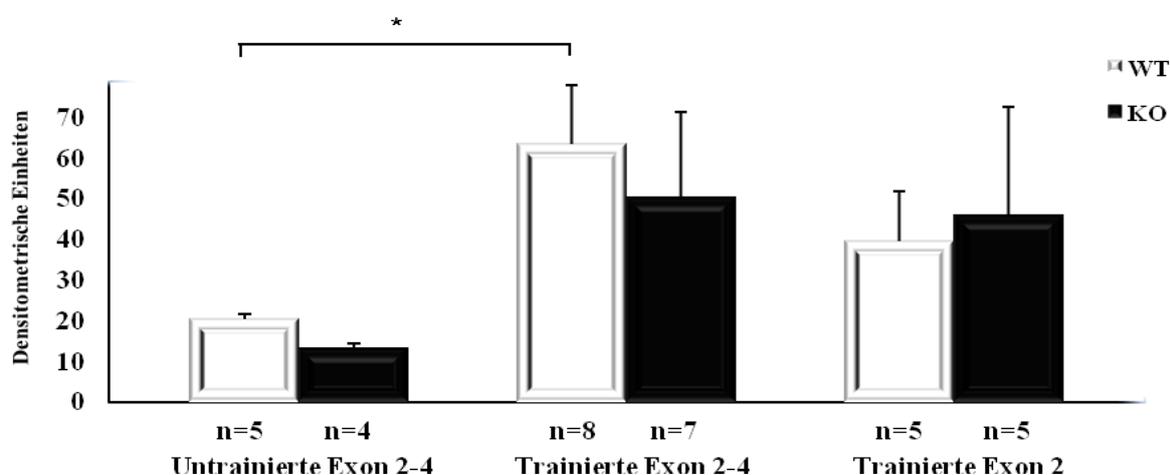


Abb. 30: p-ERK Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum Longus.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einfluss der Palladin-Defizienz auf die Veränderung der Muskelzellgröße unter Trainingsbelastung

Zur Untersuchung der Auswirkung der Palladin-Defizienz auf die trainingsbedingte Veränderung der Muskelfasergröße wurde in der vorliegenden Arbeit der Zelldurchmesser an mit Methylenblau gefärbten Semidünnschnitten gemessen.

Palladin ist in den Strukturen vorhanden, die kontraktile Bündel der Aktinfilamente beinhalten (Parast et al., 2000; Mykkänen et al., 2001) und an Verankerungsstrukturen wie der fokalen Adhäsion lokalisiert (Parast et al., 2000; Boukhelifa et al., 2001; Goicoechea et al., 2006; Rachlin & Otey, 2006; Dixon et al., 2008).

In zahlreichen Studien wurden bisher Palladin-defiziente Mausmodelle generiert, um die Rolle des Palladin-Proteins in verschiedenen Zelltypen aufzuklären. Der Verlust der Palladin-Expression führt zu einer Störung des Aufbaus von fokalen Adhäsionen, Stressfasern und Podosomen (Parast & Otey, 2000; Goicoechea et al., 2006; Dixon et al., 2008). Des Weiteren zeigen Palladin-defiziente embryonale Fibroblasten eine gestörte Gestaltung der Stressfaser, eine beeinträchtigte Zellanhaftung an den Komponenten der ECM und eine verringerte Zellmotilität (Luo et al., 2005; Liu et al., 2007; Wang & Moser, 2008). Dementsprechend führt der komplette Funktionsverlust des Palladins in KO-Mäusen zu einer embryonalen Letalität (Luo et al., 2005; Pogue-Geile et al., 2006).

Die in dieser Studie verwendeten Palladin-KO Tiere haben keinen letalen Phänotyp, wobei Proteinisoformen mit 200-kDa und 140-kDa ausgeschaltet werden. Bei diesen KO-Mäusen bleiben zudem 2 Proteinisoformen mit 90-92 kDa und 50 kDa erhalten.

Bisher bestehen keine Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss der Palladin-Defizienz auf die trainingsinduzierte Adaptation des Skelettmuskels befassen. Somit ist nicht bekannt, welche Rolle das Protein Palladin bei den Anpassungsprozessen im Skelettmuskel in Bezug auf die körperliche Aktivität spielt. In dieser Studie konnte eine leichte Reduktion der Muskelfasergröße im *M. gastrocnemius* und *M. vastus lateralis* infolge körperlichen Trainings bei KO Mäusen gegenüber WT-Mäusen beobachtet werden. Somit wird davon ausgegangen, dass die Palladin-Defizienz einen moderaten Einfluss auf die Veränderung der Muskelfasergröße unter Trainingsbelastung hat.

Im Gegensatz zu dieser Beobachtung existieren Studien, die eine deutliche Verringerung der Muskelfasergröße beim Fehlen des  $\alpha$ -Aktinins im Skelettmuskel zeigen. Es ist bereits bekannt, dass das Palladin mit  $\alpha$ -Aktinin als Aktin-assoziiertes Protein an FA interagiert (Rönty et al. 2004; Otey et al., 2005).

In zahlreichen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der  $\alpha$ -Aktinin-3-Defizienz und der Verringerung der Muskelfasergröße im Skelettmuskel festgestellt werden (MacArthur et al., 2007; Yang et al., 2009; Quinlan et al., 2010; Seto et al., 2011). Weitere Studien zeigten, dass sich der Faserdurchmesser im M. extensor digitorum longus bei  $\alpha$ -Aktinin-defizienten Mäusen wesentlich verringert (MacArthur et al., 2008). Aus diesen Befunden lassen sich Veränderungen der Muskelfasergröße im Skelettmuskel bei einem Fehlen des  $\alpha$ -Aktinins-3 deutlich erkennen. In Anbetracht der im Vergleich zur  $\alpha$ -Aktinin-Defizienz geringen Veränderungen der Muskelfasergröße bei KO Mäusen spielt ein Fehlen des Palladins im Skelettmuskel keine wesentliche Rolle bei der trainingsbedingten strukturellen Adaptation.

Bei der Analyse des Zelldurchmessers im M. vastus lateralis kam es bei den Exon 2-4 KO Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der Muskelfasergröße durch körperliches Training gegenüber Kontrolle, wohingegen das Training keine signifikante Veränderung des Zelldurchmessers bei den Exon 2 KO Mäusen bewirkte. Hierbei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Exon 2-4 KO- und Exon 2 KO Mäusen.

Wie bereits beschrieben, wurde bei Exon 2-4 KO Mäusen sowohl die 140-kDa-Isoform als auch die 200-kDa-Isoform des Palladins ausgeschaltet, während bei Exon 2 KO Mäusen nur die 200-kDa-Isoform des Palladins ausgeschaltet wurde. Die 140-kDa-Isoform des Palladins hat eine spezifische Funktion bei der Organisierung der Aktinanordnung, die an der Zellmigration und der zellulären Kontraktion beteiligt ist (Rachlin & Otey, 2006). Die 200-kDa-Isoform des Palladins kann eine wesentliche Rolle während der Sarkomerorganisation spielen, während das Fehlen der 200-kDa-Isoformen von Palladin keinen Einfluss auf Entwicklung, Lebensfähigkeit und Fertilität der Mäuse hat (Wang, 2008). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass ein Fehlen der Palladin 140- und 200 kDa-Isoform nicht zu einer grundsätzlichen Beeinträchtigung der Muskelfaseranpassung auf Trainingsbelastungen im Skelettmuskel führt. Insbesondere leitet sich diese leichte Zunahme der Muskelfasergröße trotz der Palladin-Defizienz möglicherweise von der funktionellen Kompensation durch andere Aktin-assoziierte Proteine her.

Es ist bereits bekannt, dass Palladin sich an Aktin-assoziierte FA-Proteine bindet (Wall et al., 2007). Die Multidomainstruktur des Palladins fungiert angeblich als molekulares Gerüst, das die Aktin-assoziierten Proteine rekrutiert (Mykkänen et al., 2001; Boukhelifa et al., 2004, 2006; Rönty et al., 2004; Goicoechea et al., 2006; Rachlin & Otey, 2006; Dixon et al., 2008). Weiterhin konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass beim Ausfall des Vinculins als ein FA-assoziiertes Protein in der Zelle eine Kompensation durch das erhöhte Niveau von  $\alpha$ -Actinin, Talin und Paxillin in FA erfolgt. Dabei können diese Proteine auch fokale Kontakte beim Fehlen der FA-Proteine herstellen (Volberg et al., 1995).

Solch eine Interaktion kann eine unmittelbare Bindung des  $\alpha$ -Aktinins mit der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta$ 1-Integrins enthalten (Otey et al., 1990, 1993). Dieser Befund unterstützt die oben beschriebene Möglichkeit der Kompensation der Palladin-Defizienz, da Palladin auch mit zytoplasmatischen Domänen der  $\beta$ 1-Integrine interagiert (Dixon et al., 2008; Wang & Moser, 2008; Otey et al., 2009).

Solche Kompensationsmechanismen könnten erklären, warum es nur zu kleinen Unterschieden hinsichtlich der Muskelfasergröße zwischen WT- und KO-Mäusen kommt. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu beobachten, wie andere Aktin assoziierte FA-Proteine sich beim Fehlen des Palladin-Proteins im Skelettmuskel verhalten.

#### **4. 2 Einfluss der Palladin-Defizienz auf die Veränderung der Zellkernzahl im Skelettmuskel durch körperliches Training**

Eine Skelettmuskelfaser enthält eine Vielzahl von Kernen; dies ist die Folge der Fusion mehrerer Myoblasten. Die Zellkerne sind für die Regulation der Proteinexpression verantwortlich, daher ist eine höhere Zellkerndichte mit einer potentiell höheren Proteinexpression verbunden (Zhong et al., 2005). In dieser Studie wurde weder die Zellkerndichte noch die Größe der myonukleären Domänen im Skelettmuskel gemessen. Mit Hilfe des Lichtmikroskops ließ sich unter Trainingsbelastung die Lokalisation der Zellkerne bei den WT- und den KO Mäusen verfolgen. Dabei wurde in den verwendeten Muskelzellen die zentrale Zellkernzahl im Verhältnis zur gesamten ermittelt.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es durch körperliches Training zu einem Anstieg der zentralen Zellkernzahl im Verhältnis zur gesamten Zellkernzahl sowohl bei den WT- als auch bei den Exon 2-4 KO Mäusen kommt.

Wie zuvor in der Analyse des Muskelfaserdurchmessers beobachtet, bewirkte ein vierwöchiges Training eine Zunahme der Muskelfasergröße sowohl bei den WT- und als auch bei den KO-Mäusen. Dieses Ergebnis kann auch durch die vorliegenden Befunde über eine Zunahme der zentral lokalisierten Zellkernzahl bestätigt werden. In zahlreichen Studien konnte beobachtet werden, dass sich bei der Muskelhypertrophie die zentrale Zellkernzahl erhöht (Ricoy & Cabello, 1985; Kadi et al., 1999; Carbone et al., 2000; Kadi, 2000; Paul & Rosenthal, 2002; Eriksson et al., 2005). Dabei geht diese Veränderung mit einer Vermehrung der Anzahl an Muskelzellkernen pro Muskelfaser einher (Kadi et al., 1999; Eriksson et al., 2005; van der Meer, 2011). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Muskelfasergröße und der Zellkernzahl festgestellt werden (Rosenblatt et al., 1994; Sinha-Hikim et al., 2000). Eine erhöhte Anzahl an Muskelzellkernen ist die hauptsächliche Ursache für Muskelhypertrophie (Bruusgaard et al., 2010), wohingegen eine Abnahme der Muskelfasergröße mit einer Verringerung der Zellkernzahl einhergeht (Allen et al., 1999). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass schnelle Muskelfasertypen-II mehr Muskelzellkerne als langsame Muskelfasertypen-I besitzen (Allen et al., 1996, 1997; Hikida et al., 1997).

Der in dieser Studie beobachtete Anstieg der zentralen Zellkerne unter Trainingsbelastung kann vor allem auf die Aktivierung der Satellitenzellen im Skelettmuskel zurückzuführen sein. Im Skelettmuskel sind die Aktivierung der Satellitenzellen für Hypertrophie, Reparatur und Regeneration der Muskelfaser verantwortlich (Kuang & Rudnicki, 2008). Beim Anpassungsprozess der Muskelhypertrophie stehen neue Zellkerne zur Verfügung durch einen Prozess der Satellitenzellen, der sich aus Proliferation, Differenzierung und Fusion zusammensetzt (Kadi et al., 2004). Anschließend führt dies auch zu einer Erhöhung der Genaktivität und der Proteinsynthese in der Muskelfaser (Hawke & Garry, 2001). Die Aktivierung der Satellitenzellen wird durch körperliches Training (Kadi et al., 1999; Cameron-Smith; Mackey et al., 2007; Verney et al., 2008) und verschiedene Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel HGF (hepatocyte growth factor), IGF-1 (Insulin like growth factor 1) und FGF (fibroblast growth factor) gesteuert (Lui et al., 2007). Ein weiterer Grund für die Veränderung der Zellkernlokalisation kann ein regenerativer Prozess im Skelettmuskel sein, der nach einer trainingsinduzierten Muskelschädigung wie z. B. Mikrotrauma stattfindet. In zahlreichen Studien konnte ein zentral gelegener Zellkern in regenerierten Muskelfasern beobachtet werden (Maxwell et al., 1984; Podhorska-Okolow et al., 1998; Chargé & Rudnicki, 2004; Hawke, 2005; Ehrhardt & Morgan, 2005).

Morphologisch liegt der Unterschied zwischen regenerierten Muskelfasern und unverletzten Fasern in der zentralen Position der Zellkerne (Chargé und Rudnicki, 2004). Neben der Muskelhypertrophie benötigt auch der Regenerationsprozess des Skelettmuskels die Aktivierung der Satellitenzelle, um neue Muskelfasern aus den Myoblasten zu bilden (Ishii & Lo, 2001; Chargé & Rudnicki, 2004). Im Verlauf der Muskelregeneration bei der geschädigten Muskelfaser kommt es zur Rückkehr der aktivierten Satellitenzellen in den Zellzyklus (Russell et al., 1992; Rosenblatt et al., 1994; Grounds et al., 1998).

Die Erhöhung der zentralen Zellkerne im Skelettmuskel der KO Mäuse kann auch einen Hinweis darauf geben, dass eine Muskelanpassung an die Trainingsbelastung ohne das Palladin-Protein stattfinden kann.

#### **4. 3 Einfluss der Palladin-Defizienz auf die Veränderung der Kapillarisation im Skelettmuskel durch körperliches Training.**

Der Skelettmuskel passt sich an das Niveau der Aktivität durch Änderung der strukturellen und funktionalen Faktoren des oxidativen Metabolismus an (Hudlicka et al., 1992). Ein wesentlicher Bestandteil dieser adaptiven Reaktion ist die Veränderung der Kapillarzahl hinsichtlich der Perfusion der Muskelfasern, die in der Regel nach körperlicher Aktivität ansteigt. Die erhöhte Kapillarität ermöglicht eine bessere Sauerstoffversorgung der Muskulatur und einen Austausch der Metaboliten zwischen Blutgefäßen und Muskelfasern (Tang et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass das körperliche Training keine Veränderungen der Kapillarzahl sowohl bei WT- als auch bei Exon 2-4 KO Mäusen bewirkt. Generell wird die Kapillarisation im tätigen Muskel durch die körperliche Aktivität erhöht (Hudlicka et al., 1992). Vor allem wird diese erhöhte Kapillarisation durch mechanische und metabolische Stimuli ausgelöst, die die Freisetzung der diffusionsfähigen Faktoren als angiogene Wachstumsfaktoren bewirken (Folkman & Shin, 1992; Hudlicka et al., 1992). Des Weiteren entsteht Angiogenese im Skelettmuskel als eine adaptive Reaktion auf körperliches Training (Lloyd et al., 2003). Die Angiogenese des Skelettmuskels ist eine wichtige physiologische Adaptation an den metabolischen Bedarf (Tang et al., 2004). Sie wird als die Neubildung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen bezeichnet (Folkman 1986; Chavakis & Dimmeler., 2002; Fuentes-Prior et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Wirkung auf die trainingsbedingte Kapillarisation bei WT- und KO-Mäusen kann die nicht ausreichende Trainingsintensität des Laufbandtrainings im *M. gastrocnemius* und *vastus lateralis* sein.

In zahlreichen Studien konnte beobachtet werden, dass ein hoch intensives Training zu einer Erhöhung der Kapillarisation im schnellen Muskelfasertyp-II führt (Sexton et al., 1988, Adair et al., 1990; Sexton & Laughlin, 1994; Gute et al., 1996). Ein hoch intensives Training über einen Zeitraum von zehn Wochen führt zu einer Zunahme der Kapillanzahl pro Muskelquerschnitt im *M. gastrocnemius* (Gute et al., 1994). Eine weitere Studie mit sechswöchigem Laufbandtraining mit einer Intensität von 60 Metern pro Minute zeigte bei Ratten eine Erhöhung der Kapillarisation im schnell glykolytischen Muskelfasertyp (Laughlin et al., 1988). Dagegen wirkte sich ein zwölfwöchiges Ausdauertraining mit geringer Intensität nicht auf die Zunahme der Kapillanzahl im *M. gastrocnemius* aus (Gute et al., 1994). Zudem ließ sich nach dem moderat intensiven Ausdauertraining eine Erhöhung der Kapillanzahl nur im langsamen Muskelfasertyp-I beobachten (Rossiter et al., 2005; Laughlin & Roseguini, 2008). Durch die aus den Befunden erkennbare Diskrepanz trainingsadaptiver Kapillanzahl zwischen der hohen und der geringen Intensität des Trainings kann die fehlende Wirkung auf die trainingsbedingte Kapillarisation bei WT- und KO Mäusen erklärt werden. Somit kann die in dieser Studie angewendete Intensität des Laufbandtrainings nicht ausreichend sein, die Erhöhung der Kapillanzahl im *M. gastrocnemius* und *vastus lateralis* zu bewirken. Darüber hinaus führt körperliches Training nicht nur zu einer Neubildung von Blutgefäßen, sondern auch zu einer erhöhten Expression des VEGF-mRNA im Skelettmuskel (Breen et al., 1996; Gustafson & Kraus., 2001). Die erhöhte Expression des VEGF-Proteins liefert einen entscheidenden Anreiz für die Angiogenese (Lloyd et al., 2003). In einer Studie konnte beobachtet werden, dass das Niveau des VEGF-Proteins im Muskelfasertyp-I einheitlich größer als im -typ-II ist (Annex et al., 1998). Aus dieser Beobachtung weisen Cherwek et al., (2000), darauf hin, dass diese Divergenz in der Expression des VEGF-Proteins zwischen oxidativen und glykolytischen Skelettmuskeln auf die wesentlichen und funktionalen Unterschiede zwischen den Muskelfasertypen zurückzuführen sind.

Somit ist es möglich, dass ausgehend von einer geringen Expression des VEGF im glykolytischen Muskel das körperliche Training keine Vermehrung der Kapillanzahl im *M. gastrocnemius* und *vastus lateralis* sowohl bei WT- als auch bei KO Mäusen bewirkte.

Allerdings muss angemerkt werden, dass es sich in der Wertung der Ergebnisse um eine kleine Tierzahl handelt. Aus diesem Grund lässt sich eine erkennbare Erhöhung der Kapillarzahl unter Trainingsbelastung statistisch nicht nachweisen. Um eine genauere Aussage über den Einfluss des Trainings auf die Erhöhung der Kapillarzahl treffen zu können, sollte in weiteren Untersuchungen die Tierzahl berücksichtigt werden.

#### **4.4 Verschiebung der Muskelfasertypen bei Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung**

Um zu ermitteln, welche Muskelfasertypen bei Fehlen des Palladins unter Trainingsbelastung dominieren, wurde eine SDH(Succinatdehydrogenase)-Färbung im Skelettmuskel der WT- und der KO Mäuse mittels quantitativer Histochemie durchgeführt.

Basierend auf der Verteilung der densitometrischen SDH im M. gastrocnemius, wiesen die trainierten Exon 2-4 KO Mäuse eine höhere SDH-Aktivität in den Bereichen 0-20 und 20-40 als Indiz für schnelle Fasertypen und eine geringere Aktivität in den Bereichen 80-100 und 100-120 als Indiz für langsame Fasertypen als die untrainierten Exon 2-4 KO Mäuse auf. Dies ist als eine Verschiebung zu schnellen Muskelfasertypen-II durch körperliches Training anzusehen. Im M. soleus bewirkte das körperliche Training eine leichte Verschiebung des Faserspektrums in Richtung der Muskelfasertypen-I bei den WT Mäusen. Bei den Exon 2-4 KO Mäusen ließen sich eine Erhöhung in den Bereichen 20-40 und 40-60 und eine gleichzeitige Abnahme in den Bereichen 60-80 und 80-100 beobachten. Diese Veränderungen der SDH-Aktivität sprechen für eine adaptive Verschiebung zum Muskelfasertyp-II.

Die unterschiedlichen Verteilungen der SDH-Aktivität im M. gastrocnemius und soleus sind als Folge individueller Adaptationen einzelner Muskelgruppen an das Laufbandtraining zu beurteilen.

Ein möglicher Grund für die Verschiebungen zum Fasertyp-II im M. gastrocnemius und M. soleus bei den KO Mäusen kann sein, dass im untrainierten Zustand die KO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen einen größeren Anteil am Fasertyp-I aufwiesen. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass in untrainiertem Zustand langsame Muskelfasertypen-I im M. gastrocnemius und M. soleus unter Palladin-Defizienz dominieren.

In zahlreichen Studien konnte beim Fehlen der Aktin-assoziierten Proteine wie z. B.  $\alpha$ -Aktinin die Verschiebung zum Muskelfasertyp-I beobachtet werden.

Im Tiermodell für eine Defizienz des  $\alpha$ -Aktinin zeigte sich eine erhöhte Aktivität der verschiedenen Enzyme im Skelettmuskel, die mit dem Metabolismus langsamer Muskelfasern in Zusammenhang stehen (MacArthur et al. 2008). Ebenfalls konnte in einer weiteren Studie festgestellt werden, dass  $\alpha$ -Aktinin-KO-Mäuse eine verringerte Geschwindigkeit der Kontraktion und einen erhöhten Ermüdungsresistenz haben. Dabei wird ihr Energiemetabolismus zu einem mehr aeroben und oxidativen Zustand verschoben (Quinlan et al, 2010). Beim Fehlen eines Dystrophin-Proteins konnte auch ein hoher Anteil an Fasertyp-I beobachtet werden (Hance et al., 1999; Mills et al., 2001; Vincent et al., 2007). Diese Befunde lassen eine Einschränkung des Fasertyps-II im Palladin-defizienten Skelettmuskel vermuten. Die trainingsinduzierte Verschiebung zum Muskelfasertyp-II im M. gastrocnemius und M. soleus der KO Mäuse legt somit eine kompensatorische Adaptation für die Verringerung des Anteils am Muskelfasertyp-II unter Palladin-Defizienz nahe. Hierbei kann ein möglicher Mechanismus eine Kompensation durch  $\alpha$ -Aktinin in Palladin defizienten Mäusen sein. Es ist bereits bekannt, dass das  $\alpha$ -Aktinin-3 besonders für die Funktion des schnellen Muskelfasertyps-II wichtig ist (Yang et al, 2003; MacArthur & North, 2004; Niemi & Majamaa, 2005; Clarkson et al., 2005; Moran et al., 2007; Vincent et al., 2007). Des Weiteren konnte bei der Verschiebung des langsamen Fasertyps-I zum schnellen Fasertyp-II eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -Aktinin-3 beobachtet werden (Ogura et al., 2008). Es kann vermutet werden, dass eine Kompensation durch erhöhtes  $\alpha$ -Aktinin unter Palladin Defizienz an der Regulation der langsam zu schnell Umwandlung des Fasertyps beteiligt ist.

Umgekehrt konnte keine spezifische Verteilung der SDH-Aktivität bei den KO Mäusen im M. vastus lateralis und im M. extensor digitorum longus beobachtet werden. Im M. extensor digitorum longus der WT- und der KO Mäuse ließ sich unter Trainingsbelastung eine signifikante Verringerung der SDH-Aktivität im Bereich 20-40. Dabei kam es zu einer signifikanten Zunahme der SDH-Aktivität in den Bereichen 60-80 und 80-100. Diese Veränderungen der SDH-Aktivität sprechen für eine adaptive Verschiebung zum Muskelfasertyp-I.

Beim M. vastus lateralis der WT- und der KO Tiere führte das körperliche Training zu einer signifikanten Erhöhung der SDH-Aktivität im Bereich 0-20, während es zu einer signifikanten Reduzierung im Bereich 40-60 kam. In den Bereichen zwischen 60-120 konnten keine Veränderungen der SDH-Aktivität beobachtet werden. Es wird davon ausgegangen, dass M. vastus lateralis durch das Training nicht in Richtung des oxidativen Stoffwechsels verschoben wurden.

Ein möglicher Grund dafür könnte der unzureichende Trainingsreiz vor allem hinsichtlich des Ausdauertrainings im M. vastus lateralis bei den WT- und KO Tieren sein. Generell kann das Ausdauertraining die Verschiebung der schnellen Muskelfaser hin zu einem langsamen Phänotyp bewirken (Sullivan et al. 1995; Bigard et al. 2000; Gallo et al. 2008). Bei dieser Adaptation konnten auch eine erhöhte Mitochondriendichte und oxidative Enzyme beobachtet werden (Coggan et al., 1992; Kriketos., 1995; Holloszy et al., 1998; Houle-Leroy et al., 2000; Short et al., 2003).

Im Rahmen der Umwandlung des Fasertyps führt darüber hinaus das Ausdauertraining zu einer Aktivierung von verschiedenen Regulationsproteinen, die die Transformation von Fasertyps-II zum Typ-I vermitteln. Unter anderem fördert PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$ ) die mitochondriale Biogenese und die Bildung des langsamen Fasertyps-I im Skelettmuskel (Lin et al., 2002; Terada et al., 2002; Akimoto et al., 2005; Safdar et al., 2011). Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Verschiebung des Fasertyps II zum -typ I und einer Erhöhung des PGC-1 $\alpha$  festgestellt werden (Russell et al., 2003; Akimoto et al., 2005). Die Erhöhung des PGC-1 $\alpha$  im Skelettmuskel ist vor allem von der Dauer und Intensität des Trainings abhängig. Nach einem niedrig intensiven Schwimmtraining mit einer Dauer von 120 Minuten konnte eine Erhöhung des PGC1- $\alpha$  im Muskel beobachtet werden (Goto et al., 2000). In weiteren Studien konnte auch gezeigt werden, dass das PGC1- $\alpha$  nach einem 6-wöchigen Ausdauertraining mit geringer Intensität zunimmt (Russell et al., 2003; Kim et al., 2011). Bei Ratten ließ sich nach einer sechsstündigen Trainingseinheit mit geringer Intensität eine Zunahme des PGC-1 $\alpha$  Expression feststellen (Terada et al., 2002). Dagegen konnte keine Erhöhung der PGC-1 $\alpha$  Expression nach einem Ergometertraining mit einer moderaten Intensität von 63 % der  $VO_{2max}$  beobachtet werden. In mehreren Studien an Mäusen wurde eine Intensität von 50-65% der  $VO_{2max}$  oder von 15-18 Metern pro Minute beim Laufbandtraining im Sinne einer moderaten Belastungsintensität beschrieben (Fernando et al., 1993; MacNeil & Hoffman-Goetz, 1993; Woods et al., 1993; Woods et al., 1994; Schefer & Talan, 1996). Somit ist es möglich, dass das in dieser Studie angewandte vierwöchige Laufbandtraining mit moderater Intensität keine Zunahme der PGC1- $\alpha$  Expression im Skelettmuskel bewirkt. Dies kann auch eine weitere Erklärung dafür sein, dass keine Verschiebung zu einem Muskelfasertyp-I im M. vastus lateralis unter Einfluss des Ausdauertrainings stattfand.

Um das zu überprüfen, sollte eine Analyse der PGC1- $\alpha$  Expression im M. extensor digitorum longus und vastus lateralis in weiteren Studien durchgeführt werden.

#### **4.5 Die Auswirkung der Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung auf die Aktivierung von Caspase-3 im Skelettmuskel**

Um festzustellen, wie das Fehlen des Palladins sich auf die Muskelatrophie auswirkt, wurde eine immunhistochemische Untersuchung mit Hilfe des Antikörpers gegen Caspase-3 durchgeführt, dessen Aktivität eng mit der Apoptose in Bezug auf die Muskelatrophie zusammenhängt. Des Weiteren wurden die Muskelzellen nach einer immunhistochemischen Markierung mikroskopisch ausgewertet, um die Aktivierung der Caspase-3 bestimmen zu können.

Im Wesentlichen ist die Erhöhung der Caspase-3-Aktivierung ein Indikator für die Anschaltung des Apoptose-Signalwegs, der als Vermittler der Skelettmuskelatrophie einbezogen wurde. Die Caspase-3 ist im Skelettmuskel als anfängliche Protease verantwortlich für die Abnahme des Proteins der Muskelfibrillen (Allen et al., 1997; Ikezoe et al., 2000) und spielt eine kritische Rolle bei der Proteindegradation des Muskels (Sandri et al., 2001). Weiterhin führt die Aktivierung der Caspasekaskade zur proteolytischen Spaltung vieler zellulärer Proteine mit verschiedenen biologischen Funktionen. Im Gegensatz dazu spiegelt der Ausfall der Caspase-3 Aktivität im normalen Muskel einen Widerstand der Muskelfaser gegen die Apoptose wider (Sandri et al., 2001).

In dieser Studie bewirkte körperliches Training eine Verringerung der basalen Caspase-3-Aktivierung in M. gastrocnemius, M. vastus lateralis und M. soleus sowohl bei den WT- als auch bei den KO Mäusen, wobei kein Unterschied zwischen den WT- und den KO Mäusen beobachtet werden konnte. Unter anderem kam es durch das Training lediglich bei den WT-Mäusen zu einer signifikanten Verminderung der basalen Caspase-3-Aktivierung im M. vastus lateralis, wobei das körperliche Training eine leichte Verringerung der basalen Caspase-3-Aktivierung bei den KO Mäusen bewirkte. Im M. extensor digitorum longus der KO Mäuse führte jedoch das körperliche Training zu keiner Veränderung der basalen Caspase-3 Aktivierung. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch das körperliche Training die Exon 2-4 KO Mäuse gegenüber WT Mäusen einen relativen Anstieg der basalen Caspase-3 Aktivierung aufweisen.

Es bleibt noch unklar, wie die Apoptose im Skelettmuskel nach körperlicher Aktivität entsteht. Generell könnte körperliches Training verschiedene Proteine aktivieren, die für die komplette Aktivierung der Caspase erforderlich sind (Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001).

In zahlreichen Studien konnte zudem beobachtet werden, dass die Apoptose nach kurzfristigem körperlichem Training zunimmt (Sandri et al., 1995; 1997; Podhorska-Okolow et al., 1998; 1999), wohingegen langfristiges Training eine Verminderung der Apoptose bewirkte (Siu et al., 2004). In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein 10-wöchiges Training die antioxidative Kapazität steigert (Powers et al., 1999, 2002). Es ist bekannt, dass oxidativer Stress auch zu der Apoptose führt. (Nakamura et al., 1997; Finkel & Holbrook, 2000; Kenyon, 2001). Aus den Befunden über die in dieser Studie beobachtete Verringerung der Caspase 3 Aktivierung durch ein 4-wöchiges Training ist es auch möglich, dass der Zeitraum der Trainingsbelastung eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung der Apoptose spielt. Darüber hinaus führt Ausdauertraining zu einer Zunahme der Expression des HSP 70 (Heat shock protein 70) (Kelly et al., 1996; Liu et al., 1999), das antiapoptotisch wirkt und trainierte Muskelzellen stabilisieren kann (Mosser et al., 2000). Zudem zeigte sich, dass das HSP 70 eine Aktivität der Caspase supprimiert (Beere et al., 2000; Li et al., 2000; Saleh et al., 2000). Neben dem HSP 70 kann auch die Funktion des Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) als anti-apoptotisches Molekül im zellulären Schutz gegen Apoptose relevant sein. In zahlreichen Studien zeigte sich auch eine erhöhte Expression des Bcl-2 als Reaktion auf körperliches Training (Stupka et al., 2000; Siu et al., 2004; Mahoney et al., 2005; Song et al., 2006; Kerksick et al., 2008). Somit kann vermutet werden, dass die Erhöhung dieser anti-apoptotischen Proteine sowie von HSP 70 im Skelettmuskel unter Trainingsbelastung zu einer Verminderung der Caspase-Aktivierung bei den WT- und bei den KO Mäusen führt. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen auf der Grundlage dieser Erkenntnisse, um zu überprüfen, ob sich HSP-70 Expression im Palladin-defizienten Skelettmuskel unter Trainingsbelastung erhöht.

#### **4.6 Die Auswirkung der Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung auf die Aktivierung von p-Akt im Skelettmuskel**

In der Untersuchung der Caspase-3-Aktivierung konnte bereits beobachtet werden, dass unter Trainingsbelastung die Palladin-Defizienz keine Apoptose im Skelettmuskel auslöst.

Neben dem Caspase-Signalweg wird auch die Apoptose von der Aktivierung verschiedener Signalwege reguliert werden. Unter anderem ist bekannt, dass Akt auch als Serin/Threonin-Proteinkinase an der Regulation der Apoptose beteiligt ist (Coffer et al., 1998; Sandri et al., 2004; Ceylan-Isik et al., 2006). Im Gegensatz zur apoptotischen Funktion führt die Aktivierung von Akt im Skelettmuskel zu einer Unterdrückung der Apoptose (Fujio et al., 1999; Lowlor & Rotwein., 2000). Dabei konnten auch die Phosphorylierung und Inaktivierung der apoptotischen Proteine sowie FOXO und Caspase beobachtet werden (Latres et al., 2005). Darüber hinaus spielt Akt eine wesentliche Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Metabolismus und Angiogenese (Kohn et al., 1996; Brazil et al., 2004; Ceylan-Isik et al., 2006; Knobbe et al., 2008).

In dieser Studie wurde die trainingsinduzierte Aktivierung des Akt-Signalwegs im Skelettmuskel der WT und der KO Mäuse mit Hilfe des Antikörpers gegen p-Akt überprüft. Die Aktivierung von Akt bedingt ihre PH-Domäne (Ren et al., 1997; Zong et al., 2009) und wird durch die Phosphorylierung von Akt an Thr-308 und Ser-473 reguliert (Troussard et al., 2003). Die Akt-Phosphorylierung an Thr-308 ist wichtig für die Aktivierung von Akt; die Phosphorylierung an Ser-473 bestimmt die Spezifität der Akt zu FOXO1 und FOXO3 und die geringere Aktivität der Akt (Frias et al., 2006; Guertin et al., 2006; Jacinto, 2006; Shiota et al., 2006). In dieser Studie konnte unter Trainingsbelastung eine verminderte Aktivierung von p-Akt an Threonin-308 und an Serin-473 in allen Muskeln bei WT- und bei KO Mäusen beobachtet werden. Unter anderem bewirkte das körperliche Training eine signifikant verringerte Phosphorylierung von Akt an Thr308 und Ser473 im M. extensor digitorum longus sowohl bei den WT- als auch bei den Exon 2-4 KO Mäusen.

Diese verminderte Aktivierung des Akt-Signalwegs führte zu einer Abnahme der Muskelmasse (Sandri, 2008). Die Tatsache, dass der Ausfall der  $\beta$ 1-Integrine die Akt-Phosphorylierung beeinträchtigt (Zong et al., 2009), unterstützt zudem den oben beschriebenen Befund über die Auswirkung der verminderten Aktivierung von Akt, da die Veränderung der  $\beta$ 1-Integrine-Expression zu einer anormalen Muskelstruktur führt (Hannigan et al., 1996). Eine weitere Studie zeigte, dass ein konditionales Defizit der ILK (integrin-linked kinase) im Skelettmuskel die Akt-Phosphorylierung durch körperliches Training beeinträchtigt, wobei eine deutliche Verringerung der Muskelfasergröße beobachtet werden konnte (Wang et al., 2008). In anderen Studien konnte auch festgestellt werden, dass eine verringerte Phosphorylierung von Akt mit Apoptose einhergeht (Troussard et al., 2003;

Friedrich et al. 2004). Jedoch konnten in der vorliegenden Studie trotz dieser verminderten Aktivierung von Akt weder eine verringerte Muskelfasergröße noch das Auftreten der Apoptose bei den WT- und den KO-Mäusen beobachtet werden.

Somit können die vorliegenden Ergebnisse nicht als Aktivierung von Akt unter Trainingsbelastung, sondern als eine vorübergehende Veränderung im basalen Zustand gedeutet werden. In zahlreichen Studien zeigten sich Veränderungen der Akt-Aktivierung unter Trainingsbelastung in Abhängigkeit von verschiedenen Zeitpunkten.

Im Tiermodell konnte das Training keine Veränderung der basalen Phosphorylierung von Akt an Ser-473 bewirken (Chibalin et al. 2000). Nach einem kurzfristigen Ergometertraining konnte ebenfalls keine Erhöhung der basalen Phosphorylierung von Akt an Ser-473 im Skelettmuskel beobachtet werden (Wadley et al. 2007). In einer weiteren Studie zeigte sich nach einem 3-wöchigen Ausdauertraining kein Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt an Thr-308 und Serin 473 im basalen Zustand, wobei sich die Phosphorylierung von Akt 10 Minuten nach dem Training erhöht (Frøsig et al. 2007). Des Weiteren konnte eine deutlich erhöhte Phosphorylierung von Akt an Ser-473 15 Minuten nach dem Krafttraining beobachtet werden (Coffey et al., 2009). Zu den Zeitpunkten 3 und 5 Minuten nach einer Muskelkontraktion mit elektrischer Stimulation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der p-Akt Aktivierung im Skelettmuskel (Sakamoto et al., 2002).

Darüber hinaus wird in der Literatur die Reaktion der Proteinkinase B auf körperliche Aktivität kontrovers diskutiert. In zahlreichen Studien lässt sich keine einheitliche bzw. eindeutige Aussage über trainingsinduzierte Veränderungen der Akt-Phosphorylierung finden. Nach einem kurzfristigen Ausdauertraining zeigte sich eine erhöhte Phosphorylierung von Akt an Ser-473 im Skelettmuskel (Sakamoto et al., 2004; Deshmukh et al., 2006; Howlett et al., 2006; Wilson et al., 2006). Dagegen konnte nach einem moderaten Laufradtraining keine Erhöhung der Akt-Expression beobachtet werden (Widegren et al., 1998). Auch ließen sich nach einer Ausdauerbelastung mit einer Intensität von 25 Metern pro Minute bei 10 % Steigerung auf einem Laufband keine Veränderungen der Akt-Phosphorylierung im Skelettmuskel von Ratten beobachten (Markuns et al., 1999). Diese diskrepanten Befunde hinsichtlich der trainingsbedingten Veränderung der Akt-Phosphorylierung können auf unterschiedliche Belastungsintensität, Trainingslänge und Abnahmezeitpunkte nach dem Training zurückzuführen sein. Neben diesen Faktoren kann auch die Art des Trainings für die unterschiedlichen Veränderungen der Akt-Phosphorylierung verantwortlich sein.

Des Weiteren führen verschiedene Arten des Trainings zu einer Aktivierung spezifischer Signalwege. Vor allem steigert Krafttraining die Phosphorylierung der anabolischen Akt-mTOR-Signalkaskaden mit der Aktivierung der p70 S6k, 4E-BP1, und eIF2B (translation initiation regulators) (Coffey et al., 2009).

In weiteren Studien konnte nach dem Krafttraining ein Anstieg der Akt-Phosphorylierung beobachtet werden (Creer et al. 2005; Dreyer et al. 2006; Coffey et al., 2009). Darüber hinaus kann sich der Trainingszeitraum auf die Phosphorylierung von Akt unterschiedlich auswirken. Die Phosphorylierung von Akt verringerte sich bei der Trainingsgruppe nach 21-wöchigem Krafttraining (Hulmi et al., 2009), wohingegen das 10-wöchige Krafttraining die Phosphorylierung von Akt an Serin 473 steigerte. (Leger et al. 2006; Wilkinson et al. 2008). Diesbezüglich legen Hulmi et al. (2009) nahe, dass unterschiedliche Reaktionen des Akt-Phosphorylierungszustandes im Trainingszeitraum von der Zeitwahl der Biopsie, der Dauer oder dem Typ der Trainingsperiode sowie dem Ernährungszustand abhängig sein können. Diese verschiedenen Faktoren sollten in weiteren Studien berücksichtigt werden, um besseren Aufschluss über den Einfluss des Trainings auf die Aktivierung von Akt im Skelettmuskel geben zu können.

Anhand dieser immunhistochemischen Analyse bestätigt die reduzierte basale Phosphorylierung von Akt weder die Inhibierung der Apoptose noch einen morphologischen Befund über die Zunahme der Muskelfasergröße im Skelettmuskel. Jedoch konnte auch kein Unterschied zwischen WT- und KO-Mäusen beobachtet werden, so dass die verringerte basale Phosphorylierung der Akt nicht als Folge der Palladin-Defizienz gelten kann. Aufgrund dieses Befundes ist die Palladin-Defizienz nicht an der trainingsbedingten Phosphorylierung von Akt im Skelettmuskel beteiligt.

#### **4.7 Die Auswirkung der Palladin-Defizienz unter Trainingsbelastung auf die Aktivierung von p-ERK**

In der vorliegenden Arbeit konnte die p-ERK (extracellular regulated kinase)-Aktivierung im Skelettmuskel der WT- und der KO Mäuse unter Trainingsbelastung immunhistochemisch nachgewiesen werden. In dieser Studie zeigten sich einheitliche Veränderungen der p-ERK Aktivierung in allen Muskeln unter Trainingsbelastung, wobei körperliches Training zu einer Erhöhung der p-ERK-Aktivierung in allen Muskeln der WT- und der KO Mäuse führt.

---

Unter anderem kam es durch körperliches Training zu einer signifikanten Erhöhung der p-ERK Aktivierung im M. gastrocnemius sowohl bei den WT- als auch bei den Exon 2-4 KOMäusen. Diese Erhöhung der p-ERK-Aktivierung im Skelettmuskel kann mit der in der Analyse des Zelldurchmessers beobachteten Zunahme der Muskelfasergröße unter Trainingsbelastung bei den WT- und KO Mäusen in Zusammenhang stehen.

Die Muskelhypertrophie kann die Aktivierung zusätzlicher Signalwege bewirken. Die MAPK-Familie kann in fünf Subfamilien eingeteilt werden, in ERK1/2, p38 MAPK, JNK (Jim NH2-terminal kinase), ERK3/4 und ERK 5. Diese Mitglieder der MAPK-Familie können also in die Skelettmuskelhypertrophie in Reaktion auf eine erhöhte Trainingsbelastung involviert sein (Carlson et al., 2001). Diesbezüglich konnten Long et al. (2004), einen Anstieg der p-ERK Aktivierung im hypertrophierten Muskel nach körperlichem Training nachweisen. Die Kontraktion des Skelettmuskels durch körperliches Training, die als ein wesentlicher Regulator der Proteinsynthese und Gentranskription im Skelettmuskel anerkannt wird (Booth & Thomason, 1991; Chibalin et al. 2000), ist ein wirksamer Anreger dieser MAPK- Signalwege mit ERK1/2, p38-MAPK und JNK-Signalkaskaden (Aronson et al., 1997; Widegren et al., 1998).

Abgesehen vom Trainingsfaktor werden ERK 1/2 in Reaktion auf mitogene Reize wie Wachstumsfaktoren über Rezeptoren der Tyrosinkinase, G-protein-gekoppelte Rezeptoren, Proteinkinase C und zellulären Stress aktiviert (van Biesen et al., 1996; Schonwasser et al., 1998). Zudem aktivieren Hormone, Differenzierungsfaktoren und tumorpromovierende Faktoren ERK (Lewis et al., 1998). Auf diese Weise werden Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zelle reguliert (Schramek et al., 2002).

Insgesamt konnte kein Unterschied hinsichtlich einer erhöhten Aktivierung von ERK in allen Muskeln zwischen WT- und KO Mäusen beobachtet werden. Dieses Ergebnis weist auch auf keine Beeinträchtigung der mechanischen Signaltransduktion über die ERK-Kaskade im Skelettmuskel unter Palladin-Defizienz hin. Es ist zudem zu vermuten, dass in den KO Mäusen spezifische Kompensationsmechanismen stattfinden, um die Regulation trainingsbedingter ERK-Aktivierung im Palladin-defizienten Skelettmuskel auszugleichen. Ein möglicher Mechanismus könnte eine durch die Palladin-Defizienz induzierte verstärkte Expression von anderen Aktin-assoziierten Proteinen sein, die die Aktivierung der ERK vermitteln. Vermutlich ist u.a. eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -Aktinin an der spezifischen Regulierung der Aktivierung von ERK unter Palladin-Defizienz beteiligt. In einer Studie konnte die Interaktion zwischen  $\alpha$ -Aktinin und ERK festgestellt werden (Leinweber et al.,

1999). Eine weitere Studie zeigte auch den Einfluss der  $\alpha$ -Aktinin-Expression auf die Erhöhung der ERK-Aktivierung (Triplett & Pavalko, 2006). Somit sollte in weiteren biochemischen Untersuchungen erstmals nachgewiesen werden, ob es zu einer erhöhten  $\alpha$ -Aktinin-Expression im Palladin-defizienten Skelettmuskel kommt.

In dieser Arbeit sollte erstmals geklärt werden, welchen Einfluss das Fehlen des Palladin-Proteins auf die trainingsbedingte Anpassung der Muskelzellen ausübt.

Die Erkenntnisse der hier vorliegenden Arbeit bestehen darin, dass ein Fehlen der Palladin 140 und 200 kDa-Isoform nicht zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Muskelfaseranpassung auf Laufbandbelastungen im Skelettmuskel führt.

Es konnte beobachtet werden, dass ein vierwöchiges Training gewöhnlich eine Vergrößerung der Muskelfaser im M. gastrocnemius und im M. vastus lateralis bei den KO Mäusen bewirkt. Dabei zeigten sich eine erhöhte Anzahl von zentralen Muskelzellkernen und eine unveränderte Kapillarzahl in Reaktion auf die Zunahme der Muskelfasergröße unter Trainingsbelastung. Diese morphologischen Ergebnisse konnten auch durch die Aktivität der intrazellulären Signaltransduktion, vor allem von p-ERK, bestätigt werden.

In allen Muskeln der KO-Mäuse kam es zu einer Aktivitätszunahme der p-ERK, die bisher als wesentliches Merkmal der Hypertrophie im Skelettmuskel beschrieben wurde. Diese Befunde könnten auch die Grundlage für das Verständnis der Rolle des Palladin-Proteins bei der trainingsbedingten Adaptation des Skelettmuskels liefern.

Zusammengefasst lässt sich vermuten, dass bei Defizienz des Palladins der Skelettmuskel durch Kompensation mit anderen Aktin-assoziierten Proteinen in der Lage ist, sich dem körperlichen Training effektiv anzupassen. Zukünftige Untersuchungen sollten einen Hinweis darauf geben, welche Mechanismen die Interaktion anderer Aktin-assoziierten FA-Proteine im Skelettmuskel als molekulare Kompensation für das Fehlen des Palladin-Proteins regulieren.

## 5. Zusammenfassung.

In verschiedenen Zelltypen sind Interaktionen zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix (ECM) für zahlreiche zelluläre Prozesse wie Genexpression, Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose wesentlich. Diese Interaktionen werden vor allem durch Integrine als große Familie der transmembranen Rezeptoren vermittelt, die eine Schlüsselrolle bei der Zelladhäsion an ECM spielen.

Palladin ist ein Aktin-assoziiertes Phosphoprotein, das wesentlich zur Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und der zytoskeletalen Organisation beiträgt. Multidomänen des Palladins fungieren als Bestandteil eines molekularen Gerüsts, das mehrfache Aktin-assoziierte Proteine, z.B.  $\alpha$ -Actinin, VASP, Ezrin, Profilin, Lasp-1, Esp8, und F-actin rekrutiert. Die genomischen Strukturen des Palladins der Mäuse beziehen die Präsenz dreier verschiedener Promotorregionen mit ein. Weiterhin besteht das Palladin-Gen der Mäuse aus mindestens 25 Exonen und führt zu 4 Proteinisoformen mit 200 kDa, 140kDa, 90-92 kDa und 50 kDa.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die Isoformen mit Exon 2 und Exon 2-4 von Palladin auf die trainingsbedingten Muskelanpassung auswirken und ob sie für verschiedene Adaptationen im Skelettmuskel von Bedeutung sind. Um die Funktion des Palladins im Skelettmuskel näher beleuchten zu können, wurden als Versuchstiere Palladin-knock-out Tiere (Exon 2-4 KO- und Exon 2 KO Mäuse) und Wildtyp-Tiere (Kontrollgruppe) einem körperlichen Training ausgesetzt und anschließend die Veränderungen an diversen Muskeln mittels morphometrischer und histochemischer Methoden analysiert.

In der Analyse des Zelldurchmessers konnte festgestellt werden, dass es durch körperliches Training bei KO Mäusen zu einem leichten Anstieg der Muskelfasergröße im *M. gastrocnemius* und *M. vastus lateralis* kommt. Parallel zu dieser Zunahme der Muskelfasergröße zeigte sich bei den KO Mäusen ein Anstieg der zentralen Zellkernzahl im Verhältnis zur gesamten Kernzahl, wobei unter Trainingsbelastung keine Veränderung der Kapillanzahl zu beobachten war.

Die Bestimmung der Fasertypenverteilung erfolgte mittels Histochemie zum Aktivitätsnachweis der Succinatdehydrogenase. Die Analyse der SDH-Aktivität zeigte bei den verschiedenen Muskeln ein heterogenes Bild, wobei es bei den WT- und KO Tieren im *M. extensor digitorum longus* und im *M. vastus lateralis* zu keiner Verschiebung der Muskelfasertypen kam.

Vor allem bewirkte das körperliche Training im M. gastrocnemius und M. soleus der KO Tiere eine Verschiebung des Faserspektrums in Richtung der Muskelfasertyp-II. Diese Ergebnisse weisen auf eine kompensatorische Adaptation für die Verringerung des Anteils an Muskelfasertyp-II unter Palladin-Defizienz hin. Hierbei könnte ein möglicher Mechanismus eine Kompensation durch  $\alpha$ -Aktinin in Palladin defizienten Mäusen sein, die an der Regulation der langsam zu schnell Umwandlung des Fasertyps beteiligt ist.

Diese morphologischen Befunde machen deutlich, dass die Palladin-Defizienz im Skelettmuskel die Funktion trainingsbedingter Muskeladaptationen kaum beeinträchtigt.

Neben den morphologischen Ergebnissen hinsichtlich der moderaten Auswirkung der Palladin-Defizienz auf die Muskelanpassung bestätigten sich auch trainingsbedingte Veränderungen der intrazellulären Signalmoleküle, die sich mittels der immunhistochemischen Färbung nachweisen ließen.

Ein apoptotisches Merkmal der Palladin-Defizienz im Skelettmuskel wurde durch die Analyse der basalen Caspase 3-Aktivierung mittels der Immunhistochemie untersucht. Da sich bei den KO-Mäusen unter Trainingsbelastung in allen Muskeln eine geringe Aktivierung von Caspase-3 zeigte, hatte die Palladin-Defizienz im Skelettmuskel keine Apoptose zur Folge. Die weitere immunhistochemische Untersuchung zeigte, dass es durch das körperliche Training zu einer Verringerung der basalen Phosphorylierung von Akt in allen Muskeln bei den WT- und KO Mäusen kam. Jedoch konnte keine Veränderung der basalen Akt-Phosphorylierung zwischen den WT- und KO Mäusen beobachtet werden, so dass die verringerte basale Phosphorylierung von Akt nicht als Folge der Palladin-Defizienz gelten kann. Bei der Analyse der p-ERK Aktivierung zeigte sich eine trainingsbedingte Erhöhung in allen Muskeln der WT- und der KO Mäuse, was auch als Hinweis auf morphologische Veränderungen der Skelettmuskelfaser im Sinne einer Zunahme der Muskelfasergröße zu werten ist.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde können wichtige Hinweise als Grundlage für das Verständnis der Rolle des Palladin-Proteins bei der trainingsbedingten Adaptation des Skelettmuskels liefern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen zudem die Vermutung nahe, dass bei Defizienz des Palladins der Skelettmuskel durch Kompensation mit anderen Aktin-assoziierten Proteinen in der Lage ist, sich dem körperlichen Training effektiv anzupassen. Zukünftige Untersuchungen sollten klären, welche Mechanismen die Interaktion anderer Aktin-assoziiertes FA-Proteine im Skelettmuskel als molekulare Kompensation für das Fehlen des Palladin-Proteins regulieren.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abe T, Kearns CF, Sato Y.** Muscle size and strength are increased following walk training with restricted venous blood flow from the leg muscle, Kaatsu-walk training. *J Appl Physiol.* 100(5):1460-6. 2006

**Abercrombie, M., Heaysman, J.E., Pegrum, S.M.** The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* 67, 359-367. 1971

**Adair TH, Gay WJ, Montani JP.** Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am J Physiol.* 259:393-404.1990

**Adams GR, Caiozzo VJ, Haddad F, Baldwin KM.** Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(4):C1182-95. 2002

**Adams GR, Caiozzo VJ, Haddad F, Baldwin KM.** Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(4):C1182-95. 2002

**Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z.** Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 20;280(20):19587-93. 2005

**Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR.** Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol.* 273:C579-87. 1997

**Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR.** Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol.* Aug;273:C579-87. 1997

**Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Grindeland RE, Mukku V, Edgerton VR.** Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J Appl Physiol.* 83(6):1857-61. 1997

**Allen DL, Roy RR, Edgerton VR.** Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350–1360. 1999

**Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR, Edgerton VR.** Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol.* 81(1):145-51.1996

**Amaral SL, Papanek PE, and Greene AS.** Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1163–H1169. 2001

**Anastasi G, Cutroneo G, Gaeta R, Di Mauro D, Arco A, Consolo A, Santoro G, Trimarchi F, Favaloro A.** Dystrophin-glycoprotein complex and vinculin-talin-integrin system in human adult cardiac muscle. *Int J Mol Med.* Feb;23(2):149-59. 2009

**Annex BH, Torgan CE, Lin P, Taylor DA, Thompson MA, Peters KG, Kraus WE.** Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle. *Am J Physiol.*274:H860-7.1998

**Aronson D, Violan MA, Dufresne SD, Zangen D, Fielding RA, and Goodyear LJ.** Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 99: 1251–1257. 1997

**Aronson D, Violan MA, Dufresne SD, Zangen D, Fielding RA, and Goodyear LJ.** Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 99: 1251–1257. 1997

**Baar K.** Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 38: 1939-1944. 2006

**Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitás K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC, Labeit S.** Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol.* 16;153(2):413-27. 2001

**Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2(8):469-75. 2000

**Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M.** Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80: 1215–1265. 2000

**Bershadsky A, Kozlov M, Geiger B.** Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Curr Opin Cell Biol.* 18(5):472-81. 2006

**Bevegard BS, Shepherd JT.** Reaction in man of resistance and capacity vessels in forearm and hand to leg exercise. *J Appl Physiol.* 21:123–132. 1966

**Bigard AX, Sanchez H, Birot O & Serrurier B.** Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions. *J Appl Physiol* 88, 479–486.2000

**Blanchard A, Ohanian V, Critchley D.** The structure and function of  $\alpha$ -actinin. *J Muscle Res Cell Motil* 10:280–289.1989

**Blystone SD.** Integrating an integrin: a direct route to actin. *Biochim Biophys Acta.* 5;1692(2-3):47-54. 2004

**Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD.** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 11:1014-9. 2001

**Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass, and G. D. Yancopoulos.** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 3:1014–1019. 2001

**Booth FW, Thomason DB.** Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. *Physiol Rev* 71: 541–585. 1991

**Booth FW, Thomason DB.** Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. *Physiol Rev* 71: 541–585. 1991

**Bouchard C, An P, Rice T, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J, Pérusse L, Leon AS, Rao DC.** Familial aggregation of VO<sub>2</sub>(max) response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. *J Appl Physiol.* 87(3):1003-8.1999.

**Boukhelifa M, Hwang SJ, Valtschanoff JG, Meeker RB, Rustioni A, Otey CA.** A critical role for palladin in astrocyte morphology and response to injury. *Mol Cell Neurosci.* 23(4):661-8. 2003

**Boukhelifa M, Moza M, Johansson T, Rachlin A, Parast M, Huttelmaier S, Roy P, Jockusch BM, Carpeñ O, Karlsson R, Otey CA.** The proline-rich protein palladin is a binding partner for profilin. *FEBS J* 273:26–33. 2006

**Boukhelifa M, Parast MM, Bear JE, Gertler FB, Otey CA.** Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58(1):17-29. 2004

**Boukhelifa M, Parast MM, Valtschanoff JG, LaMantia AS, Meeker RB, Otey CA.** A role for the cytoskeleton-associated protein palladin in neurite outgrowth. *Mol Biol Cell.* 12(9):2721-9. 2001

**Boukhelifa M, Parast MM, Valtschanoff JG, LaMantia AS, Meeker RB, Otey CA.** A role for the cytoskeleton-associated protein palladin in neurite outgrowth. *Mol Biol Cell.* 12(9):2721-9. 2001

**Braith RW, Graves JE, Leggett SH, Pollock ML.** Effect of training on the relationship between maximal and submaximal strength. *Med Sci Sports Exerc.* 25(1):132-8. 1993

**Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA.** Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 29(5):233-42. 2004

**Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD.** Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol.* 81(1):355-61.1996

**Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Marthin Raff, Keith Roberts, James D.Watson.** *Molekularbiologie der Zelle* 3. Auflage. 1995

**Bruusgaard JC, Johansen IB, Egner IM, Rana ZA, Gundersen K.** Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci USA.* 24;107(34):15111-6. 2010

**Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M.** Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 463-518. 1996

**Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH.** Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 28;275(30):22607-10. 2000

**Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH.** Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 28;275(30):22607-10. 2000

**Cameron-Smith D.** Exercise and skeletal muscle gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29(3):209-13. 2002

**Carbone I, Bruno C, Sotgia F, Bado M, Broda P, Masetti E, Panella A, Zara F, Bricarelli FD, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C.** Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* 54: 1373-1376. 2000

**Carlson CJ, Fan Z, Gordon SE, Booth FW.** Time course of the MAPK and PI3-kinase response within 24 h of skeletal muscle overload. *J Appl Physiol.* 91(5):2079-87. 2001

**Ceylan-Isik AF, LaCour KH, Ren J.** Sex difference in cardiomyocyte function in normal and metallothionein transgenic mice: the effect of diabetes mellitus. *J Appl Physiol.* 100(5):1638-46. 2006

**Chang HY, Yang X.** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4):821-46. 2000

**Chargé SB, Rudnicki MA.** Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84(1):209-38. 2004

**Chavakis E, Dimmeler S.** Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1;22(6):887-93. 2002

**Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N.** Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 1;15(17):2203-8. 2001

**Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N.** Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 15:2203-2208. 2001

**Cherwek DH, Hopkins MB, Thompson MJ, Annex BH, Taylor DA.** Fiber type-specific differential expression of angiogenic factors in response to chronic hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(3):H932-8. 2000

**Chibalin AV, Yu M, Ryder JW, Song XM, Galuska D, Krook A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR.** Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4; 97(1):38-43. 2000

**Clarkson PM, Devaney JM, Gordish-Dressman H, Thompson PD, Hubal MJ, Urso M, Price TB, Angelopoulos TJ, Gordon PM, Moyna NM, Pescatello LS, Visich PS, Zoeller RF, Seip RL, Hoffman EP.** ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *J Appl Physiol.* 99(1):154-63. 2005

**Clausen JP, Trap-Jensen J.** Effects of training on the distribution of cardiac output in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 42(4):611-24. 1970

**Clerk A, Michael A, Sugden PH.** Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, hsp25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochemical Journal;* 333(3):581-589. 1998

**Coffey VG, Hawley JA.** The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.,* 37: 737-763. 2007.

**Coffey VG, Pilegaard H, Garnham AP, O'Brien BJ, Hawley JA.** Consecutive bouts of diverse contractile activity alter acute responses in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 106(4):1187-97. 2009

**Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM, Holloszy JO.** Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol.* 72(5):1780-6. 1992

**Cohen P.** The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends in Cell Biology.* 7:353–361. 1997

**Cooper, G.M.** *Oncogenes.* Jones and Bartlett Publishers, Boston.1995

**Costill DL, Coyle EF, Fink WF, Lesmes GR, Witzmann FA.** Adaptations in skeletal muscle following strength training. *J Appl Physiol.* 46(1):96-9. 1979

**Creer A, Gallagher P, Slivka D, Jemiolo B, Fink W, Trappe S.** Influence of muscle glycogen availability on ERK1/2 and Akt signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 99(3):950-6. 2005

**Cross DA, Alessi DR, Cohen P.** Andjelkovich M, and Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789, 1995

**Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell.* 23; 116(2):205-19. 2004

**Davies KJ, Packer L, Brooks GA.** Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch Biochem Biophys.* 209(2):539-54. 1981

**Davis RJ.** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 15; 268(20):14553-6. 1993

**Degterev A, Boyce M, Yuan J.** A decade of caspases. *Oncogene.* 24; 22(53):8543-67. 2003

**Deshmukh A, Coffey VG, Zhong Z, Chibalin AV, Hawley JA, Zierath JR.** Exercise-induced phosphorylation of the novel Akt substrates AS160 and filamin A in human skeletal muscle. *Diabetes*. 55(6):1776-82.2006

**DeVol, DL, Rotwein P, Sadow JL, Sadow JL, Novakofski J, Bechtel PJ.** Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am. J. Physiol.* 259:E89-E95. 1990

**Dirks AJ, Leeuwenburgh.** Der Einfluss von Alter und Training auf die Apoptose im Skelettmuskel. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* Jahrgang 56, (3): 62-67. 2005

**Dixon RD, Arneman DK, Rachlin AS, Sundaresan NR, Costello MJ, Campbell SL, Otey CA.** Palladin is an actin cross-linking protein that uses immunoglobulin-like domains to bind filamentous actin. *J Biol Chem.* 7; 283(10):6222-31. 2008

**Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB.** Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol.* 15; 576. 2006

**Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE.** Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 113: 115–123, 2004

**Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE.** Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest.* 113(1):115-23. 2004

**Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL.** Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 53(4):844-50. 1982

**Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann Rev Biochem*; 68: 383–424.1999

**Edgerton VR, Roy RR.** Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. *J Biomech.* 24 Suppl 1:123-33. 1991

**Ehrhardt J, Morgan J.** Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol.* 18(5):548-53. 2005

**Eriksson A, Kadi F, Malm C, Thornell LE.** Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. *Histochem Cell Biol.* 124(2):167-75. 2005

**Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K.** Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* 42:477–485.1995.

**Fernando P, Bonen A, Hoffman-Goetz L.** Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 71(10-11):854-7. 1993

**Fernando P, Brunette S, Megeney LA.** Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J* 19: 1671–1673. 2005

**Finkel T, Holbrook NJ.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* Nov 9;408(6809):239-47. 2000

**Fleck, SJ, Kraemer WJ.** Designing Resistance Training Programs. Champaign, IL: Human Kinetics, 83–115. 1997

**Flück M, Carson JA, Gordon SE, Ziemiecki A, Booth FW.** Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle. *Am J Physiol.* 277:C152-62. 1999

**Folkman J, Shin Y.** Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267:10931–10934. 1992

**Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM.** mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol.* 19; 16(18):1865-70. 2006

**Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM.** mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol.* 19;16(18):1865-70. 2006

**Friedmann B.** Neuere Entwicklungen im Krafttraining. Muskulaere Anpassungsreaktionen bei verschiedenen Krafttrainingsmethoden. *Dtsch Z Sportmed Jahrgang 58, Nr.1* 12-18. 2007

**Friedrich EB, Liu E, Sinha S, Cook S, Milstone DS, MacRae CA, Mariotti M, Kuhlencordt PJ, Force T, Rosenzweig A, St-Arnaud R, Dedhar S, Gerszten RE.** Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol Cell Biol.* 24(18):8134-44. 2004

**Frøsig C, Rose AJ, Treebak JT, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF.** Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. *Diabetes.* 56(8):2093-102. 2007

**Fuentes-Prior P, Salvesen GS.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J,* 384: 201-232, 2004

**Fujio Y, Guo K, Mano T, Mitsuuchi Y, Testa JR, Walsh K.** Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol Cell Biol.* 19(7):5073-82. 1999

**Gallo M, Maclean I, Tyreman N, Martins KJ, Syrotuik D, Gordon T, Putman CT.** Adaptive responses to creatine loading and exercise in fast-twitch rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R1319–R1328. 2008

**Glass DJ.** Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med.* 9;344-350. 2003

**Goicoechea S, Arneman D, Disanza A, Garcia-Mata R, Scita G, Otey CA.** Palladin binds to Eps8 and enhances the formation of dorsal ruffles and podosomes in vascular smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 15;119: 3316-24. 2006

**Goicoechea S, Arneman D, Disanza A, Garcia-Mata R, Scita G, Otey CA.** Palladin binds to Eps8 and enhances the formation of dorsal ruffles and podosomes in vascular smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 15;119: 3316-24. 2006

**Goicoechea SM, Arneman D, Otey CA.** The role of palladin in actin organization and cell motility. *Eur J Cell Biol.* 87(8-9):517-25. 2008

**Goldspink DF, Garlick PJ, McNurlan MA.** Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscle undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem. J.* 210:89-98. 1983

**Goodyear L, Chang P, Sherwood D, Dufresne S, Moller D.** Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 271:E403–E408. 1996

**Gosmanov AR, Nordtvedt NC, Brown R, Thomason DB.** Exercise effects on muscle beta-adrenergic signaling for MAPK-dependent NKCC activity are rapid and persistent. *J Appl Physiol.* 93(4):1457-65. 2002

**Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T.** cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2;274(2):350-4. 2000

**Grounds MD.** Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 854, 78-91. 1998

**Grütter MG.** Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 10(6):649-55. 2000

**Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM.** 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):859-71. 2006

**Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM.** 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):859-71. 2006

**Gunning, P, Hardeman E.** Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J.* 5: 3064-3070.1991

**Gustafsson T, Kraus W.** Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci* 6:75–89. 2001

**Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K.** MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1264–1300. 1998

**Gute D, Fraga C, Laughlin MH, Amann JF.** Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. *J Appl Physiol.* 81(2):619-26.1996

**Gute D, Laughlin MH, Amann JF.** Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of interval-sprint and low-intensity, endurance-trained rats. *Microcirculation*. 1(3):183-93.1994

**Häkkinen K, Pakarinen A.** Acute hormonal responses to two different fatiguing heavy-resistance protocols in male athletes. *J Appl Physiol*. Feb;74(2):882-7. 1993

**Hance JE, Fu SY, Watkins SC, Beggs AH, Michalak M.**  $\alpha$ -Actinin-2 is a new component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Arch Biochem Biophys* 365:216–222. 1999

**Hannigan, G.E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M.G. Coppolino, G. Radeva, J. Filmus, J.C. Bell, and S. Dedhar.** Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*. 379:91–96. 1996

**Hansen, S. Kvorning T. Kjaer, M. Sjogaard. G.** The effect of short-term strength training on human skeletal muscle: the importance of physiologically elevated hormone levels. *Scand J Med Sci Sports*: 11: 347-354. 2001

**Hardt SE, Sadoshima J.** Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ : a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90: 1055-1063, 2002

**Hawke TJ, Garry DJ.** Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 91(2):534-51. 2001

**Hawke TJ.** Muscle stem cells and exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*. 33(2):63-8. 2005

**Hayashi T, Hirshman MF, Dufresne SD, Goodyear LJ.** Skeletal muscle contractile activity in vitro stimulates mitogen-activated protein kinase signaling. *Am J Physiol* 277:C701–C707. 1999

**Hayashi T, Hirshman MF, Dufresne SD, Goodyear LJ.** Skeletal muscle contractile activity in vitro stimulates mitogen-activated protein kinase signaling. *Am J Physiol* 277:C701–C707. 1999

**Her JH, Lakhani S, Zu K, Vila J, Dent P, Sturgill TW, Weber MJ.** Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *Biochem J* 296, 25-31.1993

**Her JH, Lakhani S, Zu K, Vila J, Dent P, Sturgill TW, Weber MJ.** Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *Biochem J.* 15;296:25-31. 1993

**Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE, Kraemer WJ.** Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *Anat Rec.*247(3):350-4.1997.

**Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT.** Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell.* 6(6):637-47. 1995

**Hilder TL, Carlson GM, Haystead TA, Krebs EG, Graves LM.** Caspase-3 dependent cleavage and activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase. *Mol Cell Biochem.* 275(12):233-42. 2005

**Holloszy J.** Adaptations of muscular tissue to training. *Prog Cardiovasc Dis* 18, 445–458. 1976

**Holloszy JO, Booth FW.** Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 38: 273–291.1976

**Holloszy JO, Coyle EF.** Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56, 831–838. 1984

**Holloszy JO, Kohrt WM, Hansen PA.** The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Front Biosci.* 15(3): D1011-27. 1998

**Hoppeler H, Howald H, Conley K, Lindstedt SL, Claassen H, Vock P, Weibel ER.** Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J Appl Physiol* 59: 320–327, 1985

**Houle-Leroy P, Garland T Jr, Swallow JG, Guderley H.** Effects of voluntary activity and genetic selection on muscle metabolic capacities in house mice *Mus domesticus*. *J Appl Physiol.* 89(4):1608-16. 2000

**Houle-Leroy P, Garland T Jr., Swallow JG, Guderley H.** Effects of voluntary activity and genetic selection on muscle metabolic capacities in house mice *Mus domesticus*. *J Appl Physiol* 89:1608–1616. 2000.

**Howlett KF, Sakamoto K, Yu H, Goodyear LJ, Hargreaves M.** Insulin-stimulated insulin receptor substrate-2-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity is enhanced in human skeletal muscle after exercise. *Metabolism* 55: 1046–1052, 2006

**Hudlicka O, Brown M, Egginton S.** Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* 72: 369–417. 1992

**Hudlická O.** Development and adaptability of microvasculature in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 115:215-28. 1985

**Hulmi JJ, Tannerstedt J, Selänne H, Kainulainen H, Kovanen V, Mero AA.** Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol.* 106(5):1720-9. 2009

**Ikezoe K, Yan C, Momoi T, Imoto C, Minami N, Ariga M, Nihei K, Nonaka I.** A novel congenital myopathy with apoptotic changes. *Ann Neurol.* Apr;47(4):531-6. 2000

**Ishii A, Lo SH.** A role of tensin in skeletal-muscle regeneration. *Biochem J* 15;356(3):737-45. 2001

**Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B.** SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 6;127(1):125-37. 2006

**Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B.** SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 6;127(1):125-37. 2006

**Jefferson LS, Fabian JR, Kimball SR.** Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(1):191-200. 1999

**Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Butler-Browne GS, Thornell LE.** Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem Cell Biol.* 1999 111(3):189-95. 1999

**Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Thornell LE.** Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 31(11):1528-34. 1999

**Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL.** The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol.* 1;558(3):1005-12. 2004

**Kadi F.** Adaptation of human skeletal muscle to training and anabolic steroids. *Acta Physiol Scand Suppl* 646:1–52. 2000

**Kawada S, Ishii N.** Skeletal muscle hypertrophy after chronic restriction of venous blood flow in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 37(7):1144-50. 2005

**Kelly DA, Tiidus PM, Houston ME, and Noble EG.** Effect of vitamin E deprivation and exercise training on induction of HSP70. *J Appl Physiol.* 81:2379–2385.1996

**Kenyon C.** A conserved regulatory system for aging; *Cell.* (105): 165–168. 2001

**Kerksick C, Taylor L 4th, Harvey A, Willoughby D.** Gender-related differences in muscle injury, oxidative stress, and apoptosis. *Med Sci Sports Exerc*40:1772–1780. 2008

**Kim SS, Koo JH, Kwon IS, Oh YS, Lee SJ, Kim EJ, Kim WK, Lee J, Cho JY.** Exercise training and selenium or a combined treatment ameliorates aberrant expression of glucose and lactate metabolic proteins in skeletal muscle in a rodent model of diabetes. *Nutr Res Pract.* 5(3):205-13. 2011

**Kim, PS.** The change of pre-post muscle strength and GH, IGF-I, testosterone concentration throughout resistance exercise. *Masterarbeit.* 2003

**Knobbe CB, Lapin V, Suzuki A, Mak TW.** The roles of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. *Oncogene.*18;27(41):5398-415.2008

**Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA.** Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem.* 6;271(49):31372-8.1996

**Kostic A, Sheetz MP.** Fibronectin rigidity response through Fyn and p130Cas recruitment to the leading edge. *Mol Biol Cell.* 17(6):2684-95. 2006

**Kostka T, Patricot MC, Mathian B, Lacour JR, Bonnefoy M.** Anabolic and catabolic hormonal responses to experimental two-set low-volume resistance exercise in sedentary and active elderly people. *Aging Clin Exp Res.* 15(2):123-30. 2003

**Kraemer RR, Kilgore JL, Kraemer GR, Castracane VD.** Growth hormone, IGF-I, and testosterone responses to resistive exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 24(12):1346-52. 1992

**Kriketos AD, Pan DA, Sutton JR, Hoh JF, Baur LA, Cooney GJ, Jenkins AB, Storlien LH.** Relationships between muscle membrane lipids, fiber type, and enzyme activities in sedentary and exercised rats. *Am J Physiol.* 269:R1154-62. 1995

**Kuang, S. Rudnicki, M.** The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends in Molecular Medicine,* 14 (2), 82-91. 2008

**Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD, Glass DJ.** Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol.* 24(21):9295-304. 2004

**Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, Glass DJ.** Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 2737-2744. 2005

**Laughlin MH, Cook JD, Tremble R, Ingram D, Colleran PN, Turk JR.** Exercise training produces nonuniform increases in arteriolar density of rat soleus and gastrocnemius muscle. *Microcirculation.* 13(3):175-86. 2006

**Laughlin MH, Cook JD, Tremble R, Ingram D, Colleran PN, Turk JR.** Exercise training produces nonuniform increases in arteriolar density of rat soleus and gastrocnemius muscle. *Microcirculation.* 13(3):175-86. 2006

**Laughlin MH, Korthuis RJ, Duncker DJ, Bache RJ.** Control of blood flow to cardiac and skeletal muscle during exercise. In: Rowell LB, Shepherd TJ, editors. Handbook of Physiology, Section 12. Vol(16) Bethesda, MD: Oxford Univ Press; 705–769. 1996

**Laughlin MH, Korthuis RJ, Sexton WL, Armstrong RB.** Regional muscle blood flow capacity and exercise hyperemia in high-intensity trained rats. *J Appl Physiol.* 64(6):2420-7.1988

**Laughlin MH, Roseguini B.** Mechanisms for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. *J Physiol Pharmacol.* (59)7:71-88.2008

**Laughlin MH, Roseguini B.** Mechanisms for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. *J Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 7:71-88. 2008

**Lawlor MA, Rotwein P.** Coordinate control of muscle cell survival by distinct insulin-like growth factor activated signaling pathways. *J Cell Biol.* 11;151(6):1131-40. 2000

**Leger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Deriaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, Russell AP.** Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 576: 923–933, 2006

**Leinweber BD, Leavis PC, Grabarek Z, Wang CL, and Morgan KG.** Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem J* 344:117–123, 1999

**Lele TP, Pendse J, Kumar S, Salanga M, Karavitis J, Ingber DE.** Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *J Cell Physiol.* 207(1):187-94. 2006

**Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG.** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 74:49-139. 1998

**Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, and Seo JS.** Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 275:25665–25671. 2000

**Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM.** Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 15;418(6899):797-801. 2002

**Liu XS, Li XH, Wang Y, Shu RZ, Wang L, Lu SY, Kong H, Jin YE, Zhang LJ, Fei J, Chen SJ, Chen Z, Gu MM, Lu ZY, Wang ZG.** Disruption of palladin leads to defects in definitive erythropoiesis by interfering with erythroblastic island formation in mouse fetal liver. *Blood.* 1;110(3):870-6. 2007

**Liu Y, Mayr S, Opitz-Gress A, Zeller C, Lormes W, Baur S, Lehmann M, Steinacker JM.** Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. *J Appl Physiol.* 86(1):101-4. 1999

**Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL.** Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284(5):H1668-78. 2003

**Lo Su Hao.** Focal adhesions; what's new inside. *Review Developmental Biology* 294: 280-291. 2006

**Long YC, Widegren U, Zierath JR.** Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 63(2):227-32. 2004

**Lui Y, Gampert L, Prokopchuk O, Steinacker JM.** Satellitenzellaktivierung beim Krafttraining. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 58 (1), 6-11. 2007

**Luo H, Liu X, Wang F, Huang Q, Shen S, Wang L, Xu G, Sun X, Kong H, Gu M, Chen S, Chen Z, Wang Z.** Disruption of palladin results in neural tube closure defects in mice. *Mol Cell Neurosci*. 29(4):507-15. 2005

**MacArthur DG, North KN.** A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. *Bioessays*. 26(7):786-95. 2004

**MacArthur DG, Seto JT, Raftery JM, Quinlan KG, Huttley GA, Hook JW, Lemckert FA, Kee AJ, Edwards MR, Berman Y, Hardeman EC, Gunning PW, Eastal S, Yang N, North KN.** Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nat Genet*. 39(10):1261-5. 2007

**MacArthur DG, Seto JT, Chan S, Quinlan KG, Raftery JM, Turner N, Nicholson MD, Kee AJ, Hardeman EC, Gunning PW, Cooney GJ, Head SI, Yang N, North KN.** An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. *Hum Mol Genet*. 15;17(8):1076-86. 2008

**Mackey AL, Esmarck B, Kadi F, Koskinen SO, Kongsgaard M, Sylvestersen A, Hansen JJ, Larsen G, Kjaer M.** Enhanced satellite cell proliferation with resistance training in elderly men and women. *Scand J Med Sci Sports*.17(1):34-42.2007

**MacNeil B, Hoffman-Goetz L.** Effect of exercise on natural cytotoxicity and pulmonary tumor metastases in mice. *Med Sci Sports Exerc*. 25(8):922-8. 1993

**Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA.** Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEBJ* 19:1498–1500. 2005

**Markuns JF, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ.** Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms in rat skeletal muscle. *27;274(35):24896-900.* 1999

**Maxwell LC, Faulkner JA, White TP, Hansen-Smith FM.** Growth of regenerating skeletal muscle fibers in cats. *Anat Rec. 209(2):153-63.* 1984

**McDonagh MJ, Davies CT.** Adaptive responses of mammalian skeletal muscle to exercise with high loads. *Eur J Appl Physiol 56: 178–198,* 1984

**Mills MA, Yang N, Weinberger RP, Vander Woude DL, Beggs AH, Easteal S, North KN.** 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 10:1335–1346.* 2001

**Mitra, S. K., Hanson, D. A, Schlaepfer, D. D.** Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 56-68.* 2005

**Moran C.N., Yang N., Bailey M.E., Tsiokanos A., Jamurtas A., MacArthur D.G., North K., Pitsiladis Y.P., Wilson R.H.** Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks. *Eur. J. Hum. Genet. 15:88-93.* 2007

**Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B.** The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol 20: 7146-7159.* 2000

**Mykkänen OM, Grönholm M, Rönty M, Lalowski M, Salmikangas P, Suila H, Carpén O.** Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. *Mol Biol Cell. 12(10):3060-73.* 2001

**Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J.** Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* (15): 351–369. 1997

**Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Hirofuji C, Itoh K, Itoh M, Ishihara A.** Succinate Dehydrogenase activities of fibers in the Rat extensor digitorum Longus, Soleus and Cardiac Muscles. *Arch. Histol. Cytol.* 62(4): 393-399. 1999

**Nelissen-Vrancken HJ, Boudier HA, Daemen MJ, Smits JF.** Antihypertensive therapy and adaptive mechanisms in peripheral ischemia. *Hypertension.* Nov;22(5):780-8. 1993

**Niemi A.K., Majamaa K.** Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur. J. Hum. Genet.* 13:965-969. 2005

**Ogura Y, Naito H, Kakigi R, Akema T, Sugiura T, Katamoto S, Aoki J.** Different adaptations of alpha-actinin isoforms to exercise training in rat skeletal muscles. *Acta Physiol (Oxf).* 196(3):341-9. 2009

**Olson EN, Williams RS.** Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* 22:510–519. 2000

**Ono K, Han J.** The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal;* 12(1):1-13.2000

**Otey CA, Carpen O.** Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58(2):104-11. 2004

**Otey CA, Dixon R, Stack C, Goicoechea SM.** Cytoplasmic Ig-domain proteins: cytoskeletal regulators with a role in human disease. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66(8):618-34.2009

**Otey CA, Pavalko FM, Burridge K.** An interaction between  $\alpha$ -actinin and the  $\beta$ 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* 111:721–729. 1990

**Otey CA, Rachlin A, Moza M, Arneman D, Carpen O.** The palladin/myotilin/myopalladin family of actin-associated scaffolds. *Int Rev Cytol.* 246:31-58. 2005

**Otey CA, Vasquez GB, Burridge K, Erickson BW.** Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 5;268(28):21193-7.1993

**Parast MM, Otey CA.** Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions. *J Cell Biol.* Aug 7;150(3):643-56. 2000

**Paul AC, Rosenthal N.** Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. *J Cell Biol.* 18; 156(4):751-60. 2002

**Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.** "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". *Endocr. Rev.* 22 (2): 153–83. 2001

**Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N.** Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17:1352-1365. 2003

**Pette D.** Das adaptative Potential des Skelettmuskels. *Dtsch Z Sportmed* 50(1999)262-271. 1999

**Pette. D, Staron RS.** Mammalian skeletal muscle fiber type transition. In: (ed. By) K. W. Jeon: *International Review of Cytology*, Academic Press, San Diego, (170):143-223. 1997

**Phaneuf S, Leeuwenburgh C.** Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 33(3):393-6. 2001

**Podhorska-Okolów M, Krajewska B, Carraro U, Zabel M.** Apoptosis in mouse skeletal muscles after physical exercise. *Folia Histochem. Cytobiol.* 37, 127–128. 1999

**Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K, Carraro U.** Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 24(6):518-31. 1998

**Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K, Carraro U.** Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* (24) 518–531. 1998

**Pogue-Geile KL, Chen R, Bronner MP, Crnogorac-Jurcevic T, Moyes KW, Downen S, Otey CA, Crispin DA, George RD, Whitcomb DC, Brentnall TA.** Palladin mutation causes familial pancreatic cancer and suggests a new cancer mechanism. *PLoS Med.* 3(12):e516. 2006

**Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C.** Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 31(7):987-97. 1999

**Powers SK, Lennon SL, Quindry J, Mehta JL.** Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol* 17(5):495-502. 2002

**Prior BM, Yang HT, Terjung RL.** What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol.* 97(3):1119-28. 2004

**Quinlan KG, Seto JT, Turner N, Vandebrouck A, Floetenmeyer M, Macarthur DG, Raftery JM, Lek M, Yang N, Parton RG, Cooney GJ, North KN.** Alpha-actinin-3 deficiency results in reduced glycogen phosphorylase activity and altered calcium handling in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 1;19(7):1335-46. 2010

**Raastad T, Bjørø T, Hallén J.** Hormonal responses to high- and moderate-intensity strength exercise. *Eur J Appl Physiol.* 82(1-2):121-8. 2000

**Rachlin AS, Otey CA.** Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin. *J Cell Sci.* 15;119(Pt 6):995-1004. 2006

**Ray LB, Sturgill TW.** Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 5;263(25):12721-7. 1988

**Ren J, Lew S, Wang Z, London E.** Transmembrane orientation of hydrophobic alpha-helices is regulated both by the relationship of helix length to bilayer thickness and by the cholesterol concentration. *Biochemistry.* 19;36(33):10213-20. 1997

**Ricoy JR, Cabello A.** Hypotrophy of type I fibres with central nuclei: recovery 4 years after diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 48(2):167-71. 1985

**Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature.*386:671–674. 1997

**Ronit H, Liola L, Hongein Li, Junying Yuan, Reuven S.** Need for caspases in apoptosis of trophic factor-deprived PC12 cells. *J Neurosci Res,* 50: 69-80. 1997

**Rönty M, Taivainen A, Moza M, Otey CA, Carpen O.** Molecular analysis of the interaction between palladin and alpha-actinin. *FEBS Lett.*21;566(1-3):30-4. 2004

**Rönty M, Taivainen A, Moza M, Kruh GD, Ehler E, Carpen O.** Involvement of palladin and alpha-actinin in targeting of the Abl/Arg kinase adaptor ArgBP2 to the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 15;310(1):88-98. 2005.

**Rönty MJ, Leivonen SK, Hinz B, Rachlin A, Otey CA, Kähäri VM, Carpen OM.** Isoform-specific regulation of the actin-organizing protein palladin during TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol.* 126(11):2387-96. 2006

**Rönty M, Taivainen A, Heiska L, Otey C, Ehler E, Song WK, Carpen O.** Palladin interacts with SH3 domains of SPIN90 and Src and is required for Src-induced cytoskeletal remodeling. *Exp Cell Res.* 15;313(12):2575-85. 2007

**Rosenblatt JD, Yong D, Parry DJ.** Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve* 17:608–613. 1994

**Ross A, Leveritt M.** Long-term metabolic and skeletal muscle adaptations to short-sprint training: implications for sprint training and tapering. *Sports Med.* 31(15):1063-82. 2001

**Rossiter HB, Howlett RA, Holcombe HH, Entin PL, Wagner HE, Wagner PD.** Age is no barrier to muscle structural, biochemical and angiogenic adaptations to training up to 24 months in female rats. *J Physiol.* 565: 993-1005. 2005

**Rowell LB.** Human Cardiovascular Control. Oxford: Oxford University Press; 1993

**Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Dériaz O.** Endurance training in humans leads to fiber type specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes.* 52(12):2874-81. 2003

**Russell B, Dix DJ, Haller DL, Jacobs-El J.** Repair of injured skeletal muscle: a molecular approach. *Med Sci Sports Exerc.* 24(2):189-96.1992

**Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA.** Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem.* 25; 286(12):10605-17. 2011

**Sakamoto K, Goodyear LJ.** Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 93(1):369-83. 2002

**Sakamoto K, Arnolds DE, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ.** Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 25; 319(2):419-25. 2004

**Saleh A, Srinivasula MS, Balkir L, Robbins DP, and Alnemri SE.** Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2:476–483. 2000

**Salleo A, La Spada G, Falzea G, Denaro MG, Ciccirello R.** Response of satellite cells and muscle fibers to long-term compensatory hypertrophy. *J Submicrosc Cytol.* 15(4):929-40. 1983

**Salmikangas P, Mykkänen OM, Grönholm M, Heiska L, Kere J, Carpén O.** Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 8(7):1329-36. 1999

**Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolov M, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C.** Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett.* 16;373(3):291-5. 1995

**Sandri M, Carraro U.** Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell B* 31;1373–90. 1999

**Sandri M, Carraro U.** Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(12):1373-90.1999

**Sandri M, El Meslemani AH, Sandri C, Schjerling P, Vissing K, Andersen JL, Rossini K, Carraro U, Angelini C.** Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment? *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(3): 302-12. 2001

**Sandri M, Podhorska-Okolow M, Geromel V, Rizzi C, Arslan P, Franceschi C, Carraro U.** Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophindeficient muscle of mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56,45–57. 1997

**Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL.** Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 30;117(3):399-412. 2004

**Sandri M.** Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda).* 23:160-70. 2008

**Schaller MD, Borgman CA, Parsons JT.** Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol Cell Biol.* 13(2):785-91. 1993

**Schaller MD.** Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci.* 1;123:1007-13. 2010

**Schefer V, Talan MI.** Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Exp Gerontol.* 31(3):387-92. 1996

**Schiaffino S, Bormioli SP, and Aloisi M.** Cell proliferation in rat skeletal muscle during early stages of compensatory hypertrophy. *Virchows Arch B Cell Pathol* 11:268–273.1972

**Schiaffino S, Bormioli SP, and Aloisi M.** The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. *Virchows Arch B Cell Pathol* 21:113–118. 1976.

**Schmidt E.** Ein neuer und ungewöhnlicher Signalweg erlaubt physiologischen Konzentrationen von Erythropoetin mitogene Kinasen in primären erythroiden Vorläuferzellen zu aktivieren. Dissertation, Würzburg, 2004.

**Schonwasser DC, Marais RM, Marschall CJ, Parker PJ.** Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellualr signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Molecular and Cellular Biology* 18, 790-798. 1998

**Schramek H.** MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci.* 17:62-7. 2002

**Schwartz MA:** Transmembrane signaling by integrins. *Trends Cell Biol* 2: 304-308.1992.

**Schwerk C, Schulze-Osthoff K.** Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol.* 15; 66(8):1453-8. 2003

**Seto JT, Lek M, Quinlan KG, Houweling PJ, Zheng XF, Garton F, MacArthur DG, Raftery JM, Garvey SM, Hauser MA, Yang N, Head SI, North KN.** Deficiency of  $\alpha$ -actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. *Hum Mol Genet.* 20(15):2914-27. 2011

**Sexton WL, Korthuis RJ, Laughlin MH.** High-intensity exercise training increases vascular transport capacity of rat hindquarters. *Am J Physiol.* 254:H274-8.1988

**Sexton WL, Laughlin MH.** Influence of endurance exercise training on distribution of vascular adaptations in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 266:H483-90.1994

**Sherwood DJ, Dufresne SD, Markuns JF, Cheatham B, Moller DE, Aronson D, Goodyear LJ.** Differential regulation of MAP kinase, p70(S6K), and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 276(5):E870-8. 1999

**Shiota C, Woo JT, Lindner J, Shelton KD, Magnuson MA.** Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell.* 11(4):583-9. 2006

**Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen-Schimke JM, Nair KS.** Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes.* 52(8):1888-96. 2003

**Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S.** Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E154–E164. 2002

**Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE.** Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J.* 18(10):1150–2. 2004

**Smilios I, Pilianidis T, Karamouzis M, Tokmakidis SP.** Hormonal responses after various resistance exercise protocols. *Med Sci Sports Exerc.* 35(4):644-54. 2003

**Snow MH.** Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. *AnatRec*227:437–446,1990

**Song W, Kwak HB, Lawler JM.** Exercise training attenuates age induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal.* 8(3–4):517–28. 2006

**Steller H.** Mechanisms and gene of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449. 1995

**Stone MH, Fleck SJ, Triplett NT, Kraemer WJ.** Health- and performance-related potential of resistance training. *Sports Med.* 11(4):210-31. 1991

**Stupka N, Lowther S, Chorneyko K, Bourgeois JM, Hogben C, Tarnopolsky MA.** Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol.* 89:2325–2332. 2000

**Suetta C, Clemmensen C, Andersen JL, Magnusson SP, Schjerling P, Kjaer M.** Coordinated increase in skeletal muscle fiber area and expression of IGF-I with resistance exercise in elderly post-operative patients. *Growth Horm IGF Res.* 20(2):134-40. 2010

**Sullivan VK, Powers SK, Criswell DS, Tumer N, Larochelle JS & Lowenthal D.** Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. *J Appl Physiol.* 78, 2115–2120. 1995

**Tang K, Breen EC, Gerber HP, Ferrara NM, Wagner PD.** Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiol Genomics.* Jun 17;18(1):63-9. 2004

**Taverna D, Disatnik MH, Rayburn H.** Dystrophic muscle in mice chimeric for expression of  $\alpha 5$  integrin. *J Cell Biol* 143: 849–59. 1998

**Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I.** Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 16; 296(2):350-4. 2002

**Thompson, C. B.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456–1462. 1995

**Tidball JG.** Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol* 98: 1900-1908. 2005

**Triplett JW, Pavalko FM.** Disruption of alpha-actinin-integrin interactions at focal adhesions renders osteoblasts susceptible to apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291(5):C909-21. 2006

**Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St -Arnaud R, Dedhar S.** Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *Biol Chem.* 20;278(25):22374-8. 2003

**Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St -Arnaud R, Dedhar S.** Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem.* 20;278(25):22374-8. 2003

**Van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ, Lefkowitz RJ.** G(0)-Protein  $\alpha$ -subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 271. 1266-1269. 1996

**Van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, Degens H.** The time course of myonuclear accretion during hypertrophy in young adult and older rat plantaris muscle. *Ann Anat.* 20; 193(1):56-63. 2011

**Verney J, Kadi F, Charifi N, Féasson L, Saafi MA, Castells J, Piehl-Aulin K, Denis C.** Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects. *Muscle Nerve.* 38(3):1147-54.2008

**Vincent B., De Bock K., Ramaekers M., Van den Eede E., Van Leemputte M., Hespel P.J., Thomis M.** The ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Genomics.* 19; 32(1):58-63. 2007

**Vojtek AB, Der CJ.** Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem.* 7;273(32):19925-8.1998

**Volberg T, Geiger B, Kam Z, Pankov R, Simcha I, Sabanay H, Coll JL, Adamson E, Ben-Ze'ev A.** Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *J Cell Sci.*108 (6):2253-60. 1995

**Wadley GD, Konstantopoulos N, Macaulay L, Howlett KF, Garnham A, Hargreaves M, Cameron-Smith D.** Increased insulin-stimulated Akt pSer473 and cytosolic SHP2 protein abundance in human skeletal muscle following acute exercise and short-term training. *J Appl Physiol.* 102(4):1624-31. 2007

**Wagner PD, Masanés F, Wagner H, Sala E, Miró O, Campistol JM, Marrades RM, Casademont J, Torregrosa V, Roca J.** Muscle angiogenic growth factor gene responses to exercise in chronic renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(2):R539-46. 2001

**Wall ME, Rachlin A, Otey CA, Lobo EG.** Human adipose-derived adult stem cells upregulate palladin during osteogenesis and in response to cyclic tensile strain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293(5):C1532-8. 2007

**Wang HV, Chang LW, Brixius K, Wickström SA, Montanez E, Thievessen I, Schwander M, Müller U, Bloch W, Mayer U, Fässler R.** Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J Cell Biol.* 10;180(5):1037-49. 2008

**Wang HV, Moser M.** Comparative expression analysis of the murine palladin isoforms. *Dev Dyn.* 237(11):3342-51. 2008

**Wang, HV.** Characterization of  $\beta 1$  Integrin Cytoplasmic Domain Binding Proteins. Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie. 2008

**Weineck, J.** Optimales Training: leistungsphysiologische Trainingslehre unter besonderer Berücksichtigung des Kinder- und Jugendtrainings. Erlangen: Spitta. 2002

**Widegren U, Jiang XJ, Krook A, Chibalin AV, Björnholm M, Tally M, Roth RA, Henriksson J, Wallberg-henriksson H, Zierath JR.** Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB J.* 12(13):1379-89. 1998

**Widegren U, Ryder JW, Zierath JR.** Mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle: effects of exercise and muscle contraction. *Acta Physiol Scand.* Jul; 172(3):227-38. 2001

**Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA, Rennie MJ.** Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J Physiol* 586: 3701–3717, 2008

**Wilson C, Hargreaves M, Howlett KF.** Exercise does not alter subcellular localization, but increases phosphorylation of insulin-signaling proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*290: E341–E346, 2006

**Wojtaszewski JFP, Lynge J, Jakobsen AB, Goodyear LJ, Richter EA.** Differential regulation of MAP kinase by contraction and insulin in skeletal muscle: metabolic implications. *Am J Physiol* 277:E724–E732. 1999

**Woods JA, Davis JM, Mayer EP, Ghaffar A, Pate RR.** Effects of exercise on macrophage activation for antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol.* 76(5):2177-85. 1994

**Yang N, Garton F, North K.** alpha-actinin-3 and performance. *Med Sport Sci.* 54:88-101. 2009

**Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Eastel S, North K.** ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet.* 73(3):627-31. 2003

**Yoshigi M, Hoffman LM, Jensen CC, Yost HJ, Beckerle MC.** Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol.* 24;171(2):209-15. 2005

**Yuan J.** Molecular control of life and death. *Curr Opin Cell Biol.* 7(2):211-4. 1995

**Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B.** Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 15;116:4605-13. 2003

**Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B.** Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.* Jun;32:416-20. 2004

**Zaidel-Bar R, Kam Z, Geiger B.** Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow. *J Cell Sci.* 1;118:3997-4007. 2005

**Zamir, E. und B. Geiger.** Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science,* 114:3583–3590. 2001

**Zhong H, Roy RR, Siengthai B, Edgerton VR.** Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. *J Appl Physiol.* 99(4):1494-9. 2005

**Zong H, Bastie CC, Xu J, Fassler R, Campbell KP, Kurland IJ, Pessin JE.** Insulin resistance in striated muscle-specific integrin receptor beta1-deficient mice. *J Biol Chem.* 13; 284(7):4679-88. 2009

**Zong H, Bastie CC, Xu J, Fassler R, Campbell KP, Kurland IJ, Pessin JE.** Insulin resistance in striated muscle-specific integrin receptor beta1-deficient mice. *J Biol Chem.* 13; 284(7):4679-88. 2009

---

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Proteine der Myotilin/Palladin/Myopalladin Familie (Goicoechea et al. 2002)	5
Abb. 2: Die Muskelkontraktion reguliert intrazelluläre Signalmoleküle im Skelettmuskel (Sakamoto & Goodyear, 2002)	13
Abb. 3: Drei Mäuse während der Ausdauerbelastung auf dem Laufband	17
Abb. 4: Vergleichende graphische Darstellung der Muskelfaserdurchmesser im M. gastrocnemius	33
Abb. 5: Vergleichende graphische Darstellung der Muskelfaserdurchmesser im M. vastus lateralis	34
Abb. 6: Vergleichende graphische Darstellung peripherer Zellkernzahl im M. gastrocnemius	37
Abb. 7: Vergleichende graphische Darstellung zentraler Zellkernzahl im M. gastrocnemius	37
Abb. 8: Vergleichende graphische Darstellung peripherer Zellkernzahl im M. vastus lateralis	39
Abb. 9: Vergleichende graphische Darstellung zentraler Zellkernzahl im M. vastus lateralis	39
Abb. 10: Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen	41
Abb. 11: Vergleichende graphische Darstellung der Kapillarisation im M. vastus lateralis	42
Abb. 12: Durchschnittliche Verteilung der densitometrisch gemessenen Succinatdehydrogenaseaktivität im M. gastrocnemius	45
Abb. 13: Durchschnittliche Verteilung der densitometrischen Succinatdehydrogenase im M. soleus	47
Abb. 14: Durchschnittliche Verteilung der densitometrisch gemessenen Succinatdehydrogenaseaktivität im M. extensor digitorum longus	50

---

Abb. 15: Durchschnittliche Verteilung der densitometrischen Succinatdehydrogenase im M. vastus lateralis	53
Abb. 16: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius	55
Abb. 17: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus	56
Abb. 18: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum longus	57
Abb. 19: Caspase-3 Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. vastus lateralis	58
Abb. 20: p-Akt Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius	61
Abb. 21: p-Akt (Thr308)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus	62
Abb. 22: p-Akt(thr308)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum longus	63
Abb.23: p-Akt(Thr308)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. vastus lateralis	64
Abb. 24:p-Akt(ser473)Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius	67
Abb. 25:p-Akt(ser473)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus	68
Abb. 26: p-Akt(ser473)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum longus	69
Abb. 27:p-Akt(ser473)-Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M.vastus lateralis	70
Abb. 28: p-ERK Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. gastrocnemius	72
Abb. 29: p-ERK Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. soleus	73
Abb. 30: p-ERK Aktivierung mit densitometrischer Auswertung im M. extensor digitorum longus	74

---

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Darstellung der Gruppierung der Versuchstiere	16
Tab. 2: Gruppeneinteilung zur genaueren Betrachtung der SDH-Verteilung	24
Tab. 3: Verwendete primäre Antikörper	27
Tab. 4: Sekundäre Antikörper und ihre Verdünnung	27
Tab. 5: Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) für Faserdurchmesser im M. gastrocnemius.	32
Tab. 6: Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) für Faserdurchmesser im M. vastus lateralis	33
Tab. 7: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für periphere Zellkernzahl im M. gastrocnemius	36
Tab. 8: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für zentrale Zellkernzahl im M. gastrocnemius	36
Tab. 9: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für periphere Zellkernzahl im M. vastus lateralis	38
Tab. 10: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für zentrale Zellkernzahl im M. vastus lateralis	38
Tab. 11: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Kapillarzahl im M. gastrocnemius	41
Tab.12: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Kapillarzahl im M. vastus lateralis	42
Tab. 13: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius (Caspase-3 Aktivierung)	55
Tab. 14: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus (Caspase-3 Aktivierung)	56

---

Tab. 15: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus (Caspase-3 Aktivierung)	57
Tab. 16: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. vastus lateralis (Caspase-3 Aktivierung)	58
Tab. 17: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius (p-Akt (Thr 308)-Aktivierung)	61
Tab. 18: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus (p-Akt (Thr 308)-Aktivierung)	62
Tab. 19: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus (p-Akt (Thr 308)-Aktivierung)	63
Tab. 20: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. vastus lateralis (p-Akt (Thr 308)-Aktivierung)	64
Tab. 21: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius (p-Akt(ser473)-Aktivierung)	67
Tab. 22: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus (p-Akt(ser473)-Aktivierung)	68
Tab. 23: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus (p-Akt(ser473)-Aktivierung)	69
Tab. 24: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. vastus lateralis (p-Akt(ser473)-Aktivierung)	70
Tab. 25: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. gastrocnemius (p-ERK Aktivierung)	72
Tab. 26: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. soleus (p-ERK Aktivierung)	73
Tab. 27: Mittelwert(M) und Standardabweichung(SD) für Grauwert im M. extensor digitorum longus (p-ERK Aktivierung)	74

---

---

### 7.3 Abstract

Interactions between the cytoskeleton and the extracellular matrix (ECM) in different cell types are essential for various cellular processes, including gene expression, growth, proliferation, differentiation and apoptosis. The interactions are mainly mediated by integrins as a large family of transmembrane receptors, which play key roles in cell adhesion to ECM.

Palladin is an actin-associated phosphoprotein that contributes to the maintenance of cell morphology and cytoskeletal organization.

Palladin's multidomain serves as a molecular scaffold that recruits multiple actin-associated proteins such as  $\alpha$ -actinin, VASP, ezrin, profilin, Lasp-1, Esp8, and F-actin itself. The genomic structure of palladin from a mouse implicates the presence of three different promoter regions. Moreover, palladin gene is composed of at least 25 exons and gives rise to 4 protein isoforms including the 200 kDa, 140 kDa, 90–92 kDa and 50 kDa isoforms,

The aim of this study was to investigate the effects of the palladin isoforms with exon 2 and exon 2-4 on the exercise-induced muscle adaptation and whether they are important for various adaptations in skeletal muscle. In order to illuminate the palladin function in skeletal muscle, knockout animals (exon 2 and exon 2-4 KO mice) were exposed to exercise training session and then the changes in various muscles were analyzed using morphometric and histochemical methods. The analysis of the cell diameter demonstrated, that exercise training led to a small increase in muscle fiber size in *M. gastrocnemius* and *M. vastus lateralis* from KO mice. An increase in central myonuclei number relative to total number of myonuclei in the KO mice was observed parallel with the increase in muscle fiber size, thereby no change in capillary number was observed after exercise training. The fiber type distribution was determined using quantitative histochemistry of succinate dehydrogenase. The Analysis of SDH activity showed a heterogeneous picture in various muscles, thereby exercise training led to no shift in muscle fiber types in *M. extensor digitorum longus* and in *M. vastus lateralis* from the WT- and KO mice. A 4-week treadmill training program induced a slow to fast fiber transformation in *M. gastrocnemius* and *M. soleus* from KO mice. These results suggest a compensatory adaptation for reduction in proportion of fast-twitch fibers (Type II) due to deficiency of palladin.

---

This could be a possible mechanism of compensation by  $\alpha$ -actinin in palladin deficient mice, which is involved in regulating the transformation of slow to fast fiber type.

These morphological findings indicate that the palladin deficiency in skeletal muscle hardly impaired adaptations of muscle to exercise training. In addition to the morphological results concerning the moderate effect of palladin deficiency on muscle adaptation, the training-induced changes is also confirmed by intracellular signaling molecules, that could be detected by Immunohistochemical staining. A atrophic feature of palladin deficiency in skeletal muscle was investigated by analysis of the basal caspase-3 activation using of immunohistochemistry. As demonstrated, small activation of caspase-3 was in all muscles from the KO mice under exercise load, the palladin deficiency in skeletal muscle had no consequence of apoptosis. Furthermore, the immunohistochemical analysis showed that the exercise training led to a decrease of the basal Akt phosphorylation in all muscles from the WT and KO mice. However, no change in the basal Akt phosphorylation could be observed between the WT and KO mice so that the reduced basal phosphorylation of Akt can be not considered as a consequence of the palladin deficiency.

The analysis of p-ERK showed a training-induced increase in p-ERK activation in all muscles from the WT and KO mice, what must be considered as an indication of morphological changes in skeletal muscle fiber in the sense of an increase in muscle fiber size. The findings collected in the present study can provide important information as a basis for understanding the role of the palladin protein in the exercise training-induced adaptation of skeletal muscle. Moreover, the results of this study suppose that despite palladin deficiency, the skeletal muscle is able through compensation with other actin-associated proteins to effectively adapt to exercise training. Future studies should clarify the mechanisms that regulate the interaction of other actin-associated proteins as molecular compensation for the absence of palladin protein in skeletal muscle.

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Nachname: Kim  
Vorname: Pil-Sang  
Geburtsdatum: 76.09.1976  
Geburtsort: Seoul (Südkorea)  
Familienstand: verheiratet  
E-Mail: jjllcc76@yahoo.de

### **Universitärer Werdegang**

1995-2002 Sportstudium (B.A.), Soonchunhyang Universität, Südkorea  
2002-2004 Sportstudium (M.A.), Korea Universität, Südkorea  
2004-2005 Besuch eines Sprachkurses mit einem Abschluss an der Deutschen Sporthochschule Köln,  
Seit WS 2006 Promotionsstudium an der Deutschen Sporthochschule Köln, Abteilung molekulare und zelluläre Sportmedizin

### **Weiterbildung**

03/2011 Funktionelles Krafttraining in der Sportrehabilitation,  
09/2011 Problemfeld Doping und Sport, Deutsche Sporthochschule Köln  
04/2012 Ausdauerleistungsdiagnostik-Gesundheitssport, Deutsche Sporthochschule Köln

### **Stipendien**

2002-2004 Stipendium der Graduierten-Förderung zur Finanzierung des Masterstudiums in der Fakultät für Sportwissenschaft, Korea Universität, Südkorea

### **Studienbegleitende wissenschaftliche Tätigkeiten**

2002-2004 Lehrassistent in der Fakultät für Sportwissenschaft, Korea Universität, Südkorea  
2002-2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Sportwissenschaft, Abteilung Sportphysiologie. Korea Universität, Südkorea  
Seit 2010 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Bewegungs- und Neurowissenschaft, Deutsche Sporthochschule Köln