

Aus dem Institut für Sportmedizin
des Medizinischen Universitätsklinikums Tübingen
eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Trainingsanpassung und epigenetische Modifikationen in der Skelettmuskulatur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christin-Isabell Lehrer
Tierärztin aus Stuttgart

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4169

**Aus dem Institut für Sportmedizin
des Medizinischen Universitätsklinikums Tübingen**

**eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Trainingsanpassung und epigenetische Modifikationen in der Skelettmuskulatur

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Christin-Isabell Lehrer
Tierärztin
aus Stuttgart**

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4169

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Barbara Munz
Dritte Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
exercise; muscles; organs; SDS-PAGE; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 12.12.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-034-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S.1
1.1. Muskeltypen	S.1
1.2. Aufbau des Skelettmuskels	S.1
1.3. Körperliches Training und physiologische Anpassungsreaktionen des Organismus'	S.3
1.3.1. Trainingsformen	S.3
1.3.2. Anpassungsreaktionen der Skelettmuskulatur an Training	S.3
1.3.3. Anpassungsreaktionen in anderen Organen als der Skelettmuskulatur	S.5
1.4. Epigenetik	S.7
1.4.1.1. Histonmodifikationen	S.7
1.4.2. Körperliches Training und Histonmodifikationen im Skelettmuskel	S.8
2. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	S.10
3. Material und Methoden	S.11
3.1. Material	S.11
3.1.1. Geräte	S.11
3.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	S.12
3.1.3. Primer	S.14
3.1.4. Standardpuffer und Lösungen	S.14
3.1.5. Antikörper	S.15
3.1.6. Kommerzielle Kits	S.15
3.1.7. Eukaryotische Zelllinien	S.16
3.2. Methoden	S.16
3.2.1. Zellbiologische Methoden	S.16
3.2.1.1. Auftauen und Kultivieren von C2C12-Zellen	S.16
3.2.1.2. Induktion der myogenen Differenzierung	S.17
3.2.2. Trainingsexperiment mit Versuchstieren	S.17
3.2.2.1. Verwendete Versuchstiere	S.17
3.2.2.2. Haltung der Mäuse	S.18
3.2.2.3. Laufbandtraining	S.18
3.2.2.4. Tötung und Präparation der Versuchstiere	S.20
3.2.3. Proteinchemische Methoden	S.23

3.2.3.1.	Herstellung von Histonproteinlysaten aus Zellen und aus Gewebe	S.23
3.2.3.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford)	S.24
3.2.3.3.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	S.24
3.2.3.4.	Immunologische Methoden	S.26
3.2.3.4.1.	<i>Western Blot</i>	S.26
3.2.3.4.2.	Inkubation mit Antikörpern	S.26
3.2.3.4.3.	Detektion der Antikörper	S.27
3.2.3.4.4.	<i>MemCode Reversible Protein Stain Kit</i>	S.27
3.2.3.5.	<i>Mouse XL Cytokine Array Kit</i>	S.27
3.2.4.	Molekularbiologische Methoden	S.28
3.2.4.1.	Allgemeine Richtlinien zum Arbeiten mit RNA	S.28
3.2.4.2.	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Fettgewebe	S.28
3.2.4.3.	Bestimmung von RNA-Konzentrationen	S.28
3.2.4.4.	Umschrieb von RNA in cDNA	S.28
3.2.4.5.	Semi-quantitative <i>Realtime</i> Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	S.29
3.2.5.	Statistische Auswertung	S.30
3.2.6.	Bestimmung von physiologischen Parametern	S.30
3.2.6.1.	Gewichtsbestimmung	S.30
3.2.6.2.	Herzfrequenzmessung	S.31
3.2.6.3.	Kraftmessung	S.31
3.2.6.4.	Längenmessung	S.32
3.2.6.5.	Körperfettbestimmung/Lee-Index und Gewichtsbestimmung des gonadalen Fettdepots als Maß für den Gesamtkörperfettanteil	S.32
3.2.6.6.	Knochenvermessung	S.32
3.2.6.7.	Herzvermessung / Herzgröße und Herzgewicht	S.33
3.2.6.8.	Bestimmung des Gewichts einzelner Muskeln	S.34
3.2.6.9.	Lebergewicht und leberspezifische Parameter	S.34
3.2.6.10.	Gewichtsbestimmung und Aufarbeitung der gonadalen Fettdepots	S.34
3.2.6.11.	Blutanalyse und Cytokin-Array	S.35

4.	Ergebnisse	S.36
4.1.	Physiologische Parameter	S.36
4.1.1.	Gewichtsbestimmung	S.36
4.1.2.	Herzfrequenzmessung	S.37
4.1.3.	Kraftmessung	S.39
4.1.4.	Längenmessung	S.41
4.1.5.	Körperfettbestimmung/ Lee-Index und Gewichtsbestimmung der gonadalen Fettdepots als Maß für den Gesamtkörperfettanteil	S.42
4.1.6.	Knochenvermessung	S.46
4.1.7.	Herzvermessung / Herzgröße und Herzgewicht	S.48
4.1.8.	Bestimmung des Gewichts einzelner Muskeln	S.55
4.1.9.	Lebergewicht und leberrelevante Parameter	S.57
4.1.10.	Molekularbiologische Analyse der gonadalen <i>Fettpads</i>	S.61
4.1.11.	Blutanalyse und Zytokin- <i>Array</i>	S.65
4.2.	Analyse von Histonmethylierungsmustern	S.77
4.2.1.	Untersuchung von Histonmethylierungsmustern in kultivierten Skelettmuskelzellen	S.77
4.2.2.	Histonmethylierungsmuster in der murinen Skelettmuskulatur im untrainierten und im trainierten Zustand	S.79
5.	Diskussion	S.87
5.1.	Gewichtsbestimmung	S.87
5.2.	Herzfrequenzmessung	S.87
5.3.	Kraftmessung	S.89
5.4.	Längenmessung	S.89
5.5.	Körperfettbestimmung/Lee-Index und Gewichtsbestimmung des gonadalen Fettdepots als Maß für den Gesamtkörperfettanteil	S.90
5.6.	Knochenvermessung der Tibia	S.91
5.7.	Herzvermessung / Herzgröße und Herzgewicht	S.94
5.8.	Bestimmung des Gewichts einzelner Muskeln	S.96
5.9.	Lebergewicht und leberspezifische Parameter	S.96
5.10.	Gewichtsbestimmung und molekularbiologische Analyse der gonadalen Fettdepots	S.97
5.11.	Blutanalyse und Zytokin- <i>Array</i>	S.99
5.12.	Analyse von Histonmethylierungsmustern	S.101

6. Zusammenfassung	S.104
7. Summary	S.106
8. Literaturverzeichnis	S.108
9. Abbildungsverzeichnis	S.118
10. Tabellenverzeichnis	S.124
11. Anhang	S.126

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammonperoxidsulfat
Art.	Articulatio
AST	Aspartataminotransferase
BD	größte Breite Distal
BDDT	Dithiothreitol Puffer (Histonextraktionskit Epigentek)
BP	Größte Breite proximal
Bpm	<i>beats per minute</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCL 6	Chemokin (C-C motif) Ligand 6
cDNA	copyDNA
CK	Kreatinkinase
Cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREA	Kreatinin
Ct	Threshold cycle
d	Tag
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	didesoxysribonucleosid triphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent Assay</i>
FCS	Fötale Kälberserum
G	Gramm
g	Beschleunigung
Gapdh	<i>glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase</i>

GB	Größte Breite
GL	Größte Länge
GLOB	Globulin
GLU	Glukose
GM-C-SF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GRAN	Granulozyten
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeazetylasen
HGB	Hämoglobin
HIT	<i>High Intensity Training</i>
HIIT	<i>High Intensity Intervall Training</i>
HKT/HCT	Hämatokrit
Hprt	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
Hrp	<i>Horseradish Peroxidase</i>
H ₂ O	Wasser
H3K4	Histon 3 Lysin 4
H3K4me1/2/3	Histon 3 Lysin 4 mono/di/tri-methylierung
H3K36	Histon 3 Lysin 36
i.d.R.	in der Regel
IFN γ	Interferon γ
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
kDa	Kilodalton
KD50%	kleinste Breite Diaphyse
KGW	Körpergewicht
L	Läufer
L	Liter
LAC	Laktat
LYM	Lymphozyten
M.	Musculus
M	Molar
mA	Milliampere
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt

MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mTORc1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase</i>
MONO	Monozyten
MPV	mittleres Thrombozytenvolumen
mRNA	micro Ribonukleinsäure
MULV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase</i>
MW	Mittelwert
MyH	<i>Myosin Heavy Chain</i>
N.	Nervus
NL	Nichtläufer
Nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PLT	Blutblättchen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Semi-quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion
RBC	rote Blutzellen
RDW	Erythrozyten Verteilungsbreite
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Realtime
S	Sekunde
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SG	Sammelgel
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
Tbp	<i>tata box binding protein</i>
TD	größte Tiefe distal
TEMED	Tetramethylethylethylendiamin
TG	Trenngel

TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
V.	Vena
V	Volt
v.a.	vor allem
VO ₂ max	maximale Sauerstoffaufnahme­kapazität
W	Watt
WBC	weiße Blutzellen
z.B.	zum Beispiel
µl	Microliter

1. Einleitung

1.1. Muskeltypen

Sowohl die aktive als auch die passive Bewegung erfolgt bei allen Lebewesen mit Hilfe von Muskelzellen, die sich bei komplexeren Organismen zu Muskeln zusammenschließen. Die Muskulatur kann sich sowohl verkürzen als auch mechanische Spannung aufbauen. Ermöglicht wird dies durch so genannte Myofibrillen, die kontraktile Einheiten der Muskelfaser (Junqueira et al., 1984).

Muskeln lassen sich aufgrund ihrer morphologischen und funktionellen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilen: glatte Muskulatur, quergestreifte Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur fehlt der glatten Muskulatur die Querstreifung. Die glatte Muskulatur kontrahiert langsam und ist nicht willentlich steuerbar. Man findet sie z.B. im Darm oder an Gefäßwänden. Die Herzmuskulatur nimmt eine Sonderstellung ein. Sie besitzt strukturell eine große Ähnlichkeit zur Skelettmuskulatur, hat zudem jedoch auch Eigenschaften der glatten Muskulatur und nimmt somit eine Zwischenstellung ein. Wie glatte Muskelzellen verfügt jede Herzmuskelzelle über einen Zellkern, die Skelettmuskulatur hingegen besitzt eine Vielzahl an Kernen pro Muskelzelle (Junqueira et al., 1984). Die quergestreifte Skelettmuskulatur besteht aus Muskelfasern, welche eine schnelle Kontraktion ermöglichen. Die Reizauslösung in der Skelettmuskulatur ist im Gegensatz zu den anderen Muskeltypen somatisch und nicht vegetativ gesteuert, wodurch eine aktive Bewegung ermöglicht wird.

1.2. Aufbau des Skelettmuskels

Die Skelettmuskulatur besteht aus zahlreichen gebündelten, vielkernigen Muskelfasern, welche vom *Endomysium* umhüllt sind. Mehrere dieser Muskelfasern werden durch das *Perimysium internum* zu so genannten Primärbündeln zusammengefasst. Das *Perimysium externum* fasst dann wiederum einige der Primärbündel zu Sekundärbündeln zusammen, welche dann durch das *Epimysium* umgeben werden (Abb. 1). Diese Bündel bzw. Fasergruppen stellen dann die eigentlichen Skelettmuskeln dar. An ihren Enden (Ursprung / Ansatz) gehen Skelettmuskeln i.d.R. in Sehnen über und sind so an Knochen verankert (Junqueira et al., 1984).

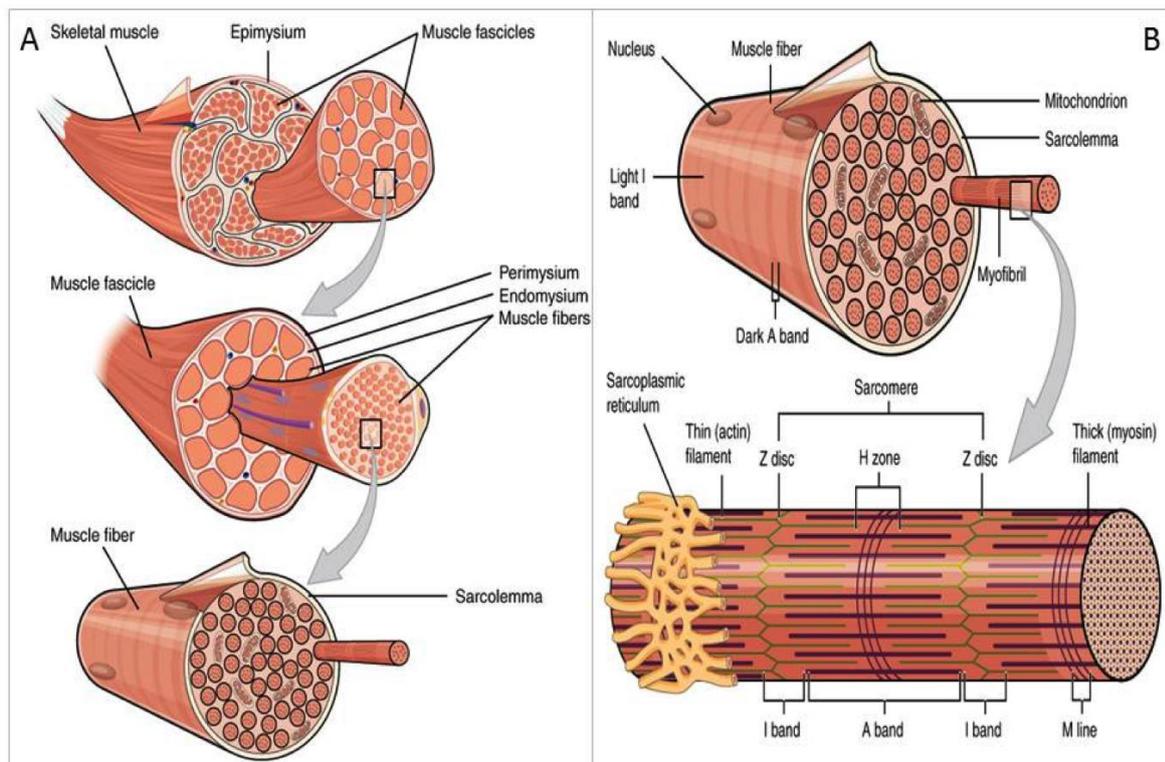


Abb.1: Schematische Darstellung der quergestreiften Skelettmuskulatur. A) Dargestellt ist die Zusammensetzung der Skelettmuskulatur. Muskelfaserbündel (*muscle fascicles*) sind von *Perimysium* umgeben, einzelne Muskelfasern von *Endomysium*. B) Dargestellt ist die Zusammensetzung einer Muskelfaser. Eine Muskelfaser ist vom Sarkolemm umgeben und besteht aus vielen einzelnen Fibrillen. (<https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/10-2-skeletal-muscle/>).

Das Sarkoplasma (Zellplasma) jeder Muskelfaser enthält fadenförmige, parallel angeordnete Myofibrillen, wodurch die charakteristische Querstreifung (helle I-Banden / dunkle A-Banden) des Skelettmuskels entsteht (Junqueira et al., 1984). Die kleinste funktionelle Einheit des kontraktiven Apparats wird als Sarkomer bezeichnet und besteht hauptsächlich aus Aktin und Myosin, welche sich mit weiteren Proteinen zu den dünnen (Aktin-) bzw. dicken (Myosin-) Filamenten zusammenlagern (Junqueira et al., 1984, Clark 2002, Scott 2001).

Das Molekül Myosin besteht aus zwei schweren und vier leichten Ketten. Die schweren Ketten (*MyH*, *myosin heavy chain*) bestehen aus den Myosinstäben, welche in Myosinköpfen enden. Letztere interagieren mit Aktin und sorgen so für die Kontraktion des Muskels. Durch Zug der Myosinköpfchen am Aktin kommt es dann zu einer Verkürzung des Sarkomers (Scott, 2001).

1.3. Körperliches Training und physiologische Anpassungsreaktionen des Organismus'

1.3.1. Trainingsformen

Körperliches Training wird zunächst in Ausdauertraining und Krafttraining unterteilt. Das Ausdauertraining stellt eine aerobe Trainingsmethode dar, welche positive Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem (vgl. 1.3.3.), aber auch auf verschiedene Krankheitsbilder wie Diabetes und Übergewicht hat. An Ausdauersportarten finden sich z.B. Laufen, Radfahren und Schwimmen, bei denen man die Trainingstypen Dauerbelastung und Intervallbelastung unterscheiden kann. Eine spezielle Form ist dabei das HIIT (*High Intensity Intervall Training*), bei welchem sich der Sportler nur sehr kurze Zeit im anaeroben Bereich bewegt, dafür aber maximal intensiv. Nach einer kurzen Pause wird der nächste Reiz im Bereich des Maximalpulses und der maximalen Sauerstoffaufnahmekapazität ($VO_2\text{max}$) gesetzt. Dadurch kommt es zu einer Verbesserung von Kraft, Schnelligkeit und Tempohärte, aber auch zur Steigerung der Fettverbrennungsrate und einem verbesserten Muskelaufbau (Übersicht bei Astorino et al., 2012, Lanzi et al., 2015, Giannaki et al., 2016).

Beim Krafttraining ist das Hauptziel, die Muskelkraft durch spezifische Übungen an Geräten zu erhöhen. Eine besondere Form stellt hierbei wiederum das HIT (*High Intensity Training*) dar. Dabei werden große Gewichte mit einer langsamen Geschwindigkeit bewegt, um die Muskeln maximal zu ermüden. Das Ziel ist es, einen starken Reiz für den Muskelaufbau zu setzen.

1.3.2. Anpassungsreaktionen der Skelettmuskulatur an Training

Skelettmuskeln zeigen eine breite Heterogenität an Muskelfasertypen mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften. Die Gesamtheit der Fasern eines Muskels bestimmt dessen strukturelle und funktionelle Eigenschaften (Pette et al., 1997, Scott, 2001). Die Fähigkeit der Skelettmuskulatur, sich an körperliches Training anzupassen, wird durch verschiedene kurz- und langfristige Strategien ermöglicht. Hierdurch wird erreicht, dass der Muskel auf weitere, ähnliche Reize, z.B. im Kraft- oder im Ausdauerbereich, in optimierter Art und Weise reagieren kann. Muskelfasertypen können auf verschiedenste Weise klassifiziert und charakterisiert werden. In Tabelle 1 findet sich eine Übersicht über das gängigste Klassifizierungssystem nach Fasertypen, bei dem die einzelnen Fasertypen mit römischen Zahlen bezeichnet werden und das u.a. auf der Expression charakteristischer *MyH* – Gene beruht, welche für unterschiedliche fasertypspezifische Isoformen der schweren Ketten des Myosins kodieren.

Fasertypen	I	Ila	Ilx / Ild	Ilb
Vorkommen	Mensch/Nager	Mensch/Nager	Mensch/Nager	Nager
Kontraktionstyp	langsam	schnell	schnell	sehr schnell
Ermüdbarkeit	niedrig	mittel	hoch	sehr hoch
Myoglobingehalt	hoch	mittel	gering	gering
Kapillardichte	hoch	mittel	gering	gering
Mitochondriendichte	hoch	mittel	gering	gering
oxidative Kapazität	hoch	hoch	mittel	niedrig
glykolytische Kapazität	niedrig	mittel	hoch	hoch
Fettstoffwechsel	hoch	mittel	niedrig	niedrig
MyH-Gen	MyH7	MyH2	MyH1	MyH4

Tabelle 1: Metabolische, kontraktile und morphologische Charakteristika der einzelnen Fasertypen des Skelettmuskels (modifiziert nach Pette et al., 1997, Scott 2001, Egan et al., 2013).

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die fasertypspezifischen Isoformen in verschiedenen Muskeln der Hinterextremität der C57BL6/J-Maus. Aufgelistet sind sowohl die im jeweilig untersuchten Muskel vorhandenen Isoformen, als auch die dominant vorherrschenden Isoformen. Für die in dieser Arbeit verwendeten C57BL6/N-Mäuse liegen in der Literatur allerdings keine Daten vor.

Muskel	vorhandene Isoformen	dominant
Extensor digitorum longus	Typ I, Ila, Ilb, Ilbd, Ic/Ilc, Ilad	Typ Ilb, Ilbd
Soleus	Typ I, Ila, Ilad, Ild	Typ I, Ila
Tibialis	Typ I, Ila, Ilb, Ilbd, Ild, Ilad, Ic/Ilc	Typ Ilb, Ilbd
Gastrocnemius	Typ I, Ilad, Ila, Ilb, Ilbd, Ild	Typ Ilb, Ilbd
Quadriceps	nicht untersucht	nicht untersucht
Adductores	nicht untersucht	nicht untersucht

Tab.2: Muskelfasertypen in der C57BL6/J-Maus, modifiziert nach Augusto (2004).

Einzelfasern enthalten allerdings nicht immer nur eine MyH-Isoform, in vielen Fällen können mehrere MyH-Isoformen parallel in einer Faser nachgewiesen werden. Solche Fasern werden als Hybridfasern bezeichnet. Hybridfasern findet man vorwiegend im Verlauf von Anpassungsreaktionen des Muskels, z.B. in Antwort auf körperliches Training (Gorza 1990, Pette et al., 2000, Scott 2001, Brummer et al. 2013). Je nach Trainingsreiz und Trainingsform

(Krafttraining / Ausdauertraining) kommt es daher zu einer vermehrten Bildung, sowie zum Abbau bestimmter MyH-Isoformen, und somit zu einer Änderung der Fasertyp-zusammensetzung des betreffenden Muskels.

Bei einem Krafttraining oder einem Sprinttraining kommt es zu einer Hypertrophie von eher schnelleren „weißen“ Muskelfasern, während Ausdauertraining die Synthese „langsamer“ Myosin-Isoformen und einen *Shift* der Muskelfasern hin zu einer höheren oxidativen Kapazität fördert (vgl. Tab.1) (Steinacker 2002, Friedmann 2007). Zudem induziert Ausdauertraining die Zunahme sowohl der Kapillar- als auch der Mitochondriendichte des Muskels, was ebenfalls die oxidative Kapazität des Muskels steigert.

Diese trainingsinduzierten Anpassungsreaktionen werden durch eine Änderung des Genexpressionsmusters hervorgerufen. Dies wird durch spezifische Signaltransduktionskaskaden reguliert, welche wiederum durch das Training selbst, z.B. über kontraktionsassoziierte Calciumströme oder Energiedepletion stimuliert werden. In Reaktion auf Krafttraining spielt dabei insbesondere mTORc1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) eine Rolle. Die Aktivierung dieses Signalwegs führt zu Änderungen des transkriptionellen Musters dahingehend, dass eine vermehrte Muskelproteinsynthese (Hypertrophie) induziert wird. In Antwort auf Ausdauertraining spielt dagegen der PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)-Signalweg eine besonders bedeutende Rolle: PGC-1 α ist ein transkriptioneller Regulator, der insbesondere die Expression mitochondrialer Gene stimuliert (Hoppeler et al., 2016), dadurch erhält der Skelettmuskel insgesamt eine erhöhte respiratorische Kapazität (Holloszy et al., 1976) und Widerstandsfähigkeit gegen Ermüdung bei lang andauernder Belastung sowie eine rasche Erholungsfähigkeit im Anschluss an die Belastung.

Zudem existieren zahlreiche weitere Signalwege, die in komplexer Art und Weise eine spezifische Anpassung des Skelettmuskels an unterschiedliche Trainingsformen ermöglichen (Übersichten bei Ehlert et al., 2013, Hoppeler et al., 2016, Sarzynski et al., 2017). So wird sichergestellt, dass der Muskel auf wiederholte Belastung „besser“ reagieren kann, dass aber auch nicht unnötig Energie verbraucht wird, indem z.B. eine hohe Muskelmasse beibehalten wird, obwohl über einen längeren Zeitraum keine kraftintensiven Aktivitäten durchgeführt werden.

1.3.3. Anpassungsreaktionen in anderen Organen als der Skelettmuskulatur

Neben den muskulären Anpassungsreaktionen finden sich insbesondere in Antwort auf Ausdauertraining auch Anpassungsreaktionen in anderen Organsystemen, wie dem

Herzkreislaufsystem oder dem Blut. Diese stellen ebenso wie die Anpassungsreaktionen der Muskulatur leistungsbestimmende Faktoren dar. Mittels einer Optimierung / Anpassung des Herzkreislaufsystems und der Atmung kann die Muskeldurchblutung bei Belastung enorm gesteigert werden. Dies geschieht zum einen durch die Weitstellung der Blutgefäße und zum anderen durch eine größere Herzförderleistung. Diese basiert bei trainierten Individuen insbesondere auf einer Steigerung des Schlagvolumens (Sportlerherz). Durch die vermehrte Durchblutung des Muskels werden CO₂ und Laktat schneller abgebaut und es kommt somit zu einer Hinauszögerung der Muskelübersäuerung. Da letztere leistungslimitierend ist, steigt somit die Leistungsfähigkeit (Güllich et al., 2013).

Durch regelmäßiges Ausdauertraining kommt es zu einer Erhöhung des Blutvolumens, insbesondere des Plasmas, wodurch der HKT (Hämatokrit) leicht abnimmt. Auf Grund dieser Anpassungsreaktion kann das Blut im Körper leichter zirkulieren und eine bessere Versorgung wird gewährleistet. Mit fortgeschrittenem Training oder auch durch Höhentraining steigt der Anteil der Erythrozyten an, wodurch eine bessere Sauerstoffsättigung erreicht wird.

Ausdauertraining steht in Verbindung mit einer Reduktion von Serumtriglyceriden, da diese vom Skelettmuskel verwertet werden können (Holloszy et al., 1976). Dies wird durch die vorwiegend aerobe Energiebereitstellung erreicht. Zudem zeigen Studien, dass regelmäßiges Training das kardiovaskuläre Risiko durch eine Reduktion des Cholesterolspiegels senkt (Meissner et al., 2010). Im Gegensatz dazu kann Krafttraining zu einer Erhöhung der Leberenzyme (AST, ALT) und der CK (Kreatinkinase) führen (Pettersson et al., 2007).

Körperliches Training besitzt zudem eine positive Auswirkung auf den Körperfettanteil. Durch das Training kommt es zum einen zu einer Reduktion der absoluten Körperfettmenge, zum anderen aber auch zu einer Erhöhung der Muskelmasse, also einem Aufbau der durch das Training angesprochenen Muskulatur. Zur Messung bzw. Abschätzung des Körperfettanteils existieren verschiedene Methoden wie z.B. die Hautfaltenmessung. Zwei einfache, bei der Maus angewandte Methoden sind die Messung des sogenannten Lee-Indexes, für dessen Ermittlung das Körpergewicht und die nasoanale Länge zueinander in Beziehung gesetzt werden, und die Bestimmung des Gewichts der gonadalen Fettdepots (vgl. 3.2.6.10.) (Rogers et al., 1980, Oztasan, 2007).

Körperliches Training zeigt zudem Auswirkungen auf die Knochenstruktur und –stärke. Untersuchungen zeigen, dass ein Sprinttraining eine Zunahme der Ausdehnung und Dichte der mittleren tibialen Struktur induziert (Souminen et al., 2017). Militärtraining führt zu einer

Zunahme der Knochendichte, wobei die Bildung von neuem Knochen direkt proportional zur Intensität der durchgeführten Belastung ist (Izard et al., 2016).

Diese Anpassungsvorgänge können zum Teil über zeitlich begrenzte Entzündungsprozesse gesteuert werden: Schon seit längerem ist bekannt, dass Training eine Entzündungsantwort induziert und dass anti-inflammatorische Medikationen verschiedene Anpassungsprozesse reduzieren können (Übersicht bei Lilja et al., 2017). Langfristig reduziert Training jedoch Entzündungsgeschehnisse (Übersicht bei Gielen et al., 2003; Flynn et al., 20017).

1.4. Epigenetik

Veränderungen durch molekulare Mechanismen, welche als Folge ein vermehrtes oder vermindertes Ablesen von Genen haben, ohne dass die Information der Gene selbst verändert wird, fasst man unter dem Begriff Epigenetik zusammen. Bestimmte Abschnitte der DNA werden dabei durch Enzyme markiert. So kann die Zelle in Antwort auf äußere Signale regulieren, welche Gene an- bzw. abgeschaltet werden. Die Epigenetik ist somit das Bindeglied zwischen Umwelteinflüssen und Genetik. Die wichtigsten epigenetischen Veränderungen sind die Methylierung von Basen der DNA sowie Methylierungen und Azetylierungen an Histonen (vgl. 1.4.1.). Viele Autoren zählen auch die Veränderung der Genexpression durch kleine regulatorische RNAs, die so genannten „micro RNAs“, zu den epigenetischen Mechanismen. In den letzten Jahren konnten viele Hinweise darauf gefunden werden, dass epigenetische Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Anpassung an körperliches Training, insbesondere auch in der Skelettmuskulatur, spielen (Übersicht bei Bloch et al., 2012).

1.4.1. Histonmodifikationen

Histone sind basische Proteine im Zellkern. Sie stellen Bestandteile des Chromatins dar und sind für die Verpackung der DNA verantwortlich. Dies geschieht in so genannten Nukleosomen. Darin ist die DNA auf einem Histonoktamer aufgewickelt, welches als Spule fungiert. Das Histonoktamer besteht aus einem zentralen Tetramer aus je zwei Dimeren der Histonproteine H3 und H4, die auf jeder Seite von zwei Dimeren der Histonproteine H2A und H2B flankiert werden (Pollard et al., 2007) (vgl. Abb.2).

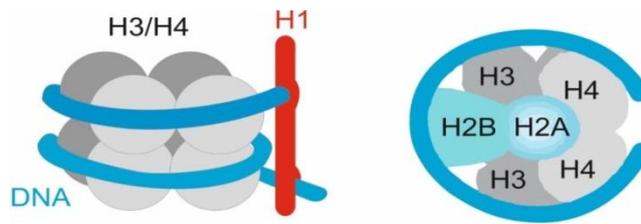


Abb.2: Schematische Darstellung eines Histonoktamers.

Das aminoternale, (N-terminale) Ende der Histonproteine stellt die Verbindungsstelle für Interaktionen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Nukleosoms dar. Dieses Ende kann von Enzymen modifiziert werden (Histonmodifikationen), wodurch die Zugänglichkeit der DNA für Proteine der Transkriptionsmaschinerie und damit die Genregulation beeinflusst wird.

Posttranslationale Modifikationen von Histonen beinhalten Azetylierungen, Phosphorylierungen, Methylierungen, Ubiquitinierungen und Poly(ADP)-Ribosylierungen. Diese Modifikationen des Chromatins können mehrere Zyklen der Zellteilung stabil überstehen, und, falls sie Keimzellen betreffen, vererbt werden (Pollard et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus der Untersuchung auf der Methylierung von H3K4 (Histon 3 Lysin 4). H3K4 kann mono-, di- und trimethyliert werden. Insbesondere die Trimethylierung wird dabei mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung gebracht (Barski et al., 2007). Die H3K4-Methylierung ist insbesondere entwicklungsbiologisch von großer Bedeutung, erstmalig wurde diese Modifikation als Regulator der bei der Embryogenese zentral wichtigen Hox-Gene entdeckt (Eissenberg et al., 2010). Die H3K4-Methylierung reguliert auch die Expression der fasertypspezifischen MyC-Gene, was dafür spricht, dass diese Modifikation auch bei der Regulation der muskulären Trainingsanpassung eine entscheidende Rolle spielen könnte (Willkomm et al., 2017).

1.4.2. Körperliches Training und Histonmodifikationen im Skelettmuskel

In jüngster Zeit mehren sich die Hinweise darauf, dass epigenetische Prozesse wie Histonmodifikationen eine entscheidende Rolle bei der Anpassung des Skelettmuskels an körperliches Training spielen könnten. So konnten McGee et al., 2009, und Thalacker-Mercer et al., 2013, nachweisen, dass sowohl eine einmalige Ausdauerbelastung als auch ein mehrwöchiges progressives Krafttraining bei humanen Probanden zu einer global gesteigerten Azetylierung des H3K36 (Lysins 36 des Histons 3) führen. Für H3K4 konnten Lochmann et al., 2015, zeigen, dass eine einmalige Laufradbelastung die Trimethylierung des H3K4s innerhalb einer spezifischen Region des *PGC-1 α* -Promotors steigert, was mit einer gesteigerten

Expression dieses Gens einhergeht, während Willkomm et al., 2017, im humanen System eine Reduktion der globalen H3K4-Trimethylierung nachweisen konnten. Zudem wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen Skelettmuskelfasertyp differentielle Histonmodifikationsmuster gefunden (Pandorf et al., 2009, Kawano et al., 2015). Dies weist darauf hin, dass diese Modifikationen eine entscheidende Rolle bei der Trainingsanpassung des Muskels spielen könnten. Darüber hinaus zeigen verschiedene Studien eine Assoziation zwischen histonmodifizierenden Enzymen, insbesondere Histondeazetylasen (HDACs), und eine Toleranz gegenüber körperlicher Belastung (*exercise tolerance*) (Potthoff et al., 2007, Hong et al., 2017). Histonmodifikationsprozesse spielen vermutlich auch bei der Steuerung der Muskelmasse eine Rolle (Barreiro et al., 2013). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass epigenetische Prozesse in zahlreiche unterschiedliche Aspekte der Trainingsanpassung involviert sein könnten.

2. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Inhalt der vorliegenden Arbeit war es, ein Laufbandtraining in einem murinen Modellsystem, zunächst als Pilotprojekt mit insgesamt acht Mäusen durchzuführen, mit dem Ziel

- A) das physiologische Anpassungsmuster an dieses Training zu charakterisieren und
- B) eine mögliche Veränderung der Histon-Methylierungsmuster in der Skelettmuskulatur in Antwort auf die körperliche Aktivität zu analysieren.

Folgende spezifische Fragestellungen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden:

1. Welchen Einfluss hat ein zehnwöchiges Laufbandtraining auf ausgewählte physiologische Parameter bei der Maus?

In trainierten und untrainierten Tieren sollten physiologische Parameter im Bereich des Skelettsystems (Knochen / Knorpel), des Fettgewebes, des Herz-Kreislaufsystems, des Blutes und der Skelettmuskulatur untersucht und verglichen werden.

2. Wie beeinflusst körperliches Training Histonmodifikationsmuster in der Skelettmuskulatur?

Im Anschluss an das zehnwöchige Laufbandtraining sollte die Skelettmuskulatur der Hinterextremität präpariert und die Histon-Methylierungsmuster im M. *gastrocnemius* hinsichtlich einer Veränderung der Mono-, Di-, und Trimethylierung analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

abcTM, Animal Blood Counter, MTS ID: 303734,
Model: ADC VET, Nummer: 907AB6018
BeadBug Microtube Homogenizer

Canon CanoScan LiDE 210
Corning® LSETM Vortex Mixer
DPU-414 Thermal Printer

Elektronische Präzisionswaage Bp 610
Eppendorf BioPhotometer
Electrophoresis Power Supply Consort EV231
Heizblockthermostat TH 21

HeraeusTM MultifugeTM X1R Centrifuge
iCycler iQTM Real-Time PCR Detection System
Laboratory refrigerator, MediLine -20°C
Laufband

Magnetrührer MR 3001

Mikro200R Zentrifuge

Mikrobiologischer Brutschrank
Mikroskop Wilovert 30
Mini-PROTEAN® 3 Cell

Pipette (1-10µl, 20-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)
Pipettor
PhysioSuite®
Rollenmischer RM5

scil animal care company,
Guernee, USA
Multimed Biotechnologie Kontor,
Kirchheim unter Teck
Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Corning Incorporated, Corning, USA
Seiko Instruments GmbH, Neu-
Isenburg
Sartorius GmbH, Göttingen
Eppendorf AG, Hamburg
Consort bvba, Tumahout, Belgien
DITABIS AG – Digital Biomedical
Imaging Systems AG, Pforzheim
Thermo Scientific, Karlsruhe
Bio-RAD Laboratories GmbH, München
Liebherr, Kirchdorf
Panlab / Harvard Apparatus, March-
Hugstetten
Heidolph Instruments Labortechnik,
Schwabach
Hettich Holding Beteiligungs- und
Verwaltungs GmbH, Tuttlingen
Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Bio-RAD Laboratories GmbH,
München
Eppendorf AG, Hamburg
Brand, Wertheim
Kent Scientific Corporation, UK
Ingenieurbüro Cat M. Zipperer GmbH,
Staufen im Breisgau

Shaking water bath 1083

Sonorex TK52H

Tecan Mikroplatten-Reader

Tiefkühlschrank HERAfreeze HFU 400 T -50°C
to -86°C

Transblot SD Semidry Transfer Cell

Unimax 2010, rotierender Plattformschüttler

VetTest® 8008, Tockenchemie-Analysegerät

Gesellschaft für Labortechnik,
Burgwedel

BANDELIN electronic GmbH&Co. KG,
Berlin

Tecan Trading AG, Switzerland

Thermo Scientific, Karlsruhe
Bio-RAD Laboratories GmbH,
München

Heidolph Instruments Labortechnik,
Schwabach

Idexx GmbH, Ludwigsburg

3.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid 40% (37,5:1)

Amersham Hyperfilm ECL (18x24cm)

Autoradiography GBX developer/replenisher

BSA – (bovine serum albumin)

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)

EDTA-Röhrchen

Einmalpipetten (5ml, 10ml, 50ml)

Ethanol 99,8% AnalR NORMAPUR

Ethanol 96% AnalR NORMAPUR

Ethanol vergällt

GBX Fixer and Replenisher

Gesundheitsprofil für Kleintiere (Testplättchen)

Glaskapillare Hkt/Hct 32mm/9µl

Glutamax Supplement

Immun-Blot® PVDF Membrane

Isopropanol

Küvetten (UV-Küvette Uvette)

Serva, Heidelberg

GE Healthcare Europe GmbH,
Freiburg

Carestream Health Deutschland
GmbH, Kodak, Stuttgart

Sigma, Aldrich, Steinheim

Gibco, UK / Biochrom

Sarstedt AG & Co KG., Nürnbrecht

Coming Incorporated, Coming, USA

VWR International GmbH, Darmstadt

VWR International GmbH, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Kodak GmbH, Stuttgart

Idexx GmbH, Ludwigsburg

Hirschmann, Neckartenzlingen

Thermo Fisher Scientific, Waltham,
USA

Bio-Rad, München

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Eppendorf AG, Hamburg

Kaleidoscope *Prestained Protein Ladder*

Laktat Profil (Testplättchen)

Lithium-Heparin-Röhrchen

Methanol AnalR NORMAPUR

Mikroreaktionsgefäße (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2ml, 5ml)

Milchpulver, *Blotting grade*, fettarm

M-MLV Reverse Transkriptase, RNase-frei

M-MLV RT 5x Buffer

Nuclease-free water

Optimem

Pefabloc® SC-Protease-Inhibitor

Penicillin/Streptomycin

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)

Precellys Homogenizers

Qiashredder

Random Primers (20µg)

RNA-later®

Serum-Röhrchen

Schieblehre

Semi-skirted 96-well PCR Plate 0,2ml

SsoFast EvaGreen Supermix 5ml

Stickstoff (flüssig)

Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Trypanblau

Trypsin (10x)

Tween-20

Wasser demineralisiert, nicht keimfrei

Westernbright Chemilumineszenz-Substrat für Film

Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)

Zellkulturflaschen mit Filtertop (250ml, 500ml)

Bio-RAD Laboratories GmbH,
München

Idexx GmbH, Ludwigsburg

Sarstedt AG & Co KG., Nürnberg

VWR International GmbH, Darmstadt

Eppendorf AG, Hamburg

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Promega GmbH, Mannheim

Promega GmbH, Mannheim

Qiagen GmbH, Hilden

Gibco, UK

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Gibco, UK

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Sarstedt, Nürnberg

PEQLAB Biotechnologie GmbH,
Erlangen

Qiagen GmbH, Hilden

Promega GmbH, Nürnberg

Ambion / Sigma Aldrich, Steinheim

Sarstedt AG & Co KG., Nürnberg

INOXYD, Hahn und Kolb, Helios

Sarstedt, Nürnberg

Bio-RAD Laboratories GmbH,
München

Liebherr GmbH, Ehingen

Serva, Heidelberg

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

Serva, Heidelberg

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Biozym, Hessisch-Oldendorf

Eppendorf AG, Hamburg

Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.3. Primer

Primer von Eurofins Genomics GmbH (Standort Ebersberg), selbst entworfen:

Maus-Lipocalin 2 <i>forward primer</i>	5'-AATGTCACCTCCATCCTGGT-3'
Maus-Lipocalin 2 <i>reverse primer</i>	5'-AACTGGTTGTAGTCCGTGGT-3'
Maus-GM-CS-F (<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>) <i>forward primer</i>	5'-TAACGAGTTCTCCTTCAAGAAGCTA-3'
Maus-GM-CS-F (<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>) <i>reverse primer</i>	5'-AGGCTGTCTATGAAATCCGCA-3'
Maus-Angiopoetin 2 <i>forward primer</i>	5'-TACAAAGAGGGCTTCGGGAG-3'
Maus-Angiopoetin 2 <i>reverse primer</i>	5'-TTCCTGGTTGGCTGATGCTA-3'
Maus-Leptin <i>forward primer</i>	5'-CCAGGATGACACCAAACCC-3'
Maus-Leptin <i>reverse primer</i>	5'-AGCACATTTTGGGAAGGCAG-3'
Maus-Gapdh (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>) <i>forward primer</i>	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
Maus-Gapdh (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>) <i>reverse primer</i>	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'
Maus-Hprt (<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>) <i>forward primer</i>	5'-GTACAGCCCCAAAATGGTTAAG-3'
Maus-Hprt (<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>) <i>reverse primer</i>	5'-CACAAACGTGATTCAAATCCCTG-3'
Maus-Tbp (<i>tata box binding protein</i>) <i>forward primer</i>	5'-GAGAGCCACGGACAACCTGC-3'
Maus-Tbp (<i>tata box binding protein</i>) <i>reverse primer</i>	5'-GGGAAGCCCAACTTCTGCAC-3'

3.1.4. Standardpuffer und Lösungen

Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1x	100ml 10x PBS 900ml Wasser (Roth)
Tris-Buffered Saline (TBS)	500mM Tris-HCl pH 7,3 (in H ₂ O)
Tris-Buffered Saline with Tween (TBS-T)	100ml 10x TBS 899ml Wasser (Roth) 1ml Tween 20
Blockierungsreagenz (10% <i>skim milk</i>)	20g Milchpulver, auf 200ml mit 1xTBS-T auffüllen)

3.1.5. Antikörper

Primäre Antikörper			
Name	Organismus und Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-H3K4me1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	BioCat GmbH, Heidelberg / Epigentek, #C10005 Antikörper-Kit
Anti-H3K4me2	Kaninchen, polyklonal	1:1000	
Anti-H3K4me3	Kaninchen, polyklonal	1:1000	
Anti-H3K4me3	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signalling, Frankfurt, #9751
Anti-H3K4me3	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Active Motif, Aachen, #39160
Anti-H3 gesamt	Maus, monoklonal	1:15000	Abcam, Cambridge, UK, ab2483

Sekundäre Antikörper			
Name	Organismus und Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-H3K4me1-3	Ziege Anti Rabbit, HRP- gekoppelt	1:5000	BioCat GmbH, Heidelberg / Epigentek
Peroxidase- conjugated AffiniPure Goat Anti Rabbit IgG (H+L) fragment specific		1:50000	Jackson Immuno Research Laboratories, bezogen über Dianova Cat. No 111-035-045
Peroxidase- conjugated AffiniPure Goat Anti Mouse IgG Fc fragment specific,		1:50000	Jackson Immuno Research Laboratories, bezogen über Dianova Cat. No 111-035-045

3.1.6. Kommerzielle Kits

*Amersham ECLTM Advance Western Blotting
Detection Kit*

GE Healthcare, Freiburg

Bradford Assay

Bio-RAD Laboratories GmbH,
München

EpiQuick Total Histone Extraction Kit

BioCat GmbH, Heidelberg

<i>MemCode Reversible Stain Kit</i>	Pierce / Thermo Scientific, Rockford, USA
<i>Mouse XL Cytokine Array Kit</i>	R&D Systems Europe Ltd, UK
<i>Pierce™ BCA für Proteinbestimmung</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
<i>RNeasy Lipid Tissue Minikit</i>	Qiagen, Hilden

3.1.7. Eukaryotische Zelllinien

C2C12	murine Mäusemyoblasten, nicht transformiert (Helen Blau, Stanford University), ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
RMZ-RC2	humane Zelllinie, alveoläre Rhabdomyosarkomzellen
HeLa	humane Zelllinie, Epithelzellen eines Zervixkarzinoms

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Auftauen und Kultivieren von C2C12-Zellen

Die im Experiment verwendeten C2C12 Zellen (10^5) wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 40ml Kulturmedium (*Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 1%Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin und 20% FCS; entspricht dem verwendeten Kulturmedium für diese Zelllinie) überführt. Die Zellen wurden dann bei 200g für vier Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment in 2 ml Kulturmedium resuspendiert, und in eine Zellkulturflasche (T25) mit 3ml Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. An Tag drei wurde auf ein Kulturmedium mit 10% Serumgehalt gewechselt. Ab einer Dichte von 50-60% wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden mit sterilem 1xPBS (37°C) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 3ml 0,25% (1x) Trypsin/EDTA bedeckt und fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde zum Stoppen der Trypsinierung Kulturmedium mit einem Serumgehalt von 10% zugegeben und das Medium sowie die Zellen in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 200g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen weiter kultiviert.

3.2.1.2. Induktion der myogenen Differenzierung

Nach Erreichen einer Dichte von 80-90% wurden die Zellen aus mehreren Flaschen unter Verwendung von 1xTrypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst, vereinigt und abzentrifugiert (200g, 5 min). Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen PBS (37°C) resuspendiert und unter Zuhilfenahme von Trypanblau (1:10) gezählt. Von den vier ausgezählten Quadraten der Neubauer-Zählkammer wurde der Mittelwert berechnet und dieser mit dem Kehrwert des Kammerfaktors eines Quadrates (10^4) sowie dem Verdünnungsfaktor (Trypanblau und PBS) multipliziert. Für die Berechnung der Zellzahl gilt somit folgende Formel:

Zellen/ml = Mittelwert x 10^4 x 10 x Verdünnungsfaktor PBS.

Für die Induktion der myogenen Differenzierung wurden die Zellen in 10%igem Kulturmedium in Kulturplatten mit je sechs Vertiefungen überführt (10^5 Zellen / Vertiefung). Nach Erreichen einer Dichte von 70-80% wurde Differenzierungsmedium (Optimem + 2% FCS) hinzugegeben. Nach vier bis fünf Tagen fand unter diesen Bedingungen eine fast vollständige Differenzierung zu Myotuben statt, welche fotografisch (Abb.53) festgehalten wurde. Pro Differenzierungstag wurden aus jeweils zwei Vertiefungen die Zellen mit 1xTrypsin/EDTA vom Boden abgelöst, vereinigt, mit PBS gewaschen und bei 200g für fünf Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellsediment nach zweimaligem Waschen in 1xPBS in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C für die anschließende Isolierung der Histone gelagert (siehe 3.2.3.1.).

3.2.2. Trainingsexperiment mit Versuchstieren

3.2.2.1. Verwendete Versuchstiere

Für das Laufbandexperiment wurden männliche C57BL/6NCrl-Mäuse im Alter von sieben Wochen verwendet (insgesamt acht Tiere). Eine Genehmigung des Tierexperiments lag vom Regierungspräsidium Tübingen vor (Genehmigungsnummer TVA M9/14). Zudem wurden die Muskeln der Hinterextremitäten von Mäusen präpariert, die der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden und kein Trainingsexperiment durchliefen, welche im Folgenden als Testmäuse bezeichnet werden. Es handelte sich ebenfalls um C57BL/6 (Subtyp nicht näher spezifiziert)-Mäuse, welche allerdings defizient für TLR2 und TLR4 (TLR2(-/-), TLR4(-/-)) waren, im Alter von sechs Wochen (TM1), sechs Monaten (TM2 + 3) und sieben Wochen (TM4 + 5).

3.2.2.2. Haltung der Mäuse

Für das Trainingsexperiment wurden insgesamt acht Mäuse (#109 - #116) des Inzuchtstammes C57BL/6N von Charles River verwendet. Alle acht Mäuse wurden im Alter von sieben Wochen angeliefert. Um hormonelle, bzw. zyklusbedingte Schwankungen zu vermeiden, wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet.

Die Tiere wurden in Standard-Makrolon-Käfigen (Typ II-*long*-Käfigen) mit geeigneter Einstreu und Zellstoff gehalten. Der Drahtgitterdeckel beinhaltet eine Futtermulde und einen abgeteilten Flaschenhalter für 250ml-Flaschen. Es wurden jeweils zwei Mäuse zusammen in einem Käfig bei einer Umgebungstemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55–65% gehalten. Von 17– Uhr erfolgte eine automatisierte Dunkelphase. Die Tiere erhielten eine Standard-Haltungsdiät und Wasser *ad libitum* (Abb.3). Aufgrund von Streitigkeiten / Revierkämpfen wurden die Tiere im Verlauf des Versuches zum Teil getrennt. In der Gruppe der Läufer wurden am Ende der vierten Woche des Trainingsexperimentes Maus #111 von #112 getrennt. Zu Beginn der fünften Trainingswoche wurden in der Gruppe der Nichtläufer sowohl Maus #109 von #110, als auch Maus #115 von #116 getrennt. Maus #113 und #114 aus der Gruppe der Läufer verblieben bis zum Abschluss des Trainingsexperimentes ohne Rangkämpfe in einem Käfig. Die einzeln gehaltenen Mäuse erhielten zum Schutz ein Holzhäuschen in ihrem Käfig. Alle Tierexperimente erfolgten unter behördlicher Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen.

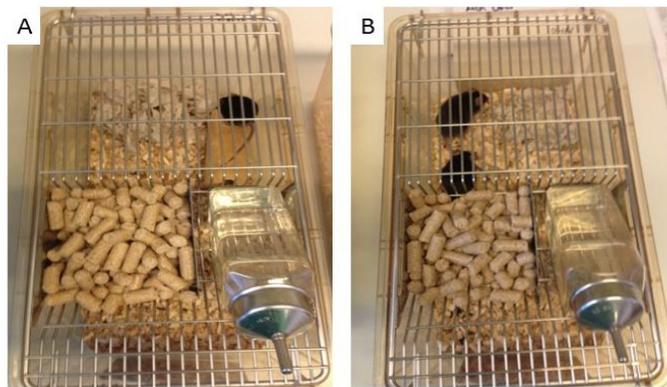


Abb.3: Makrolon-Käfig mit Haltung von (A) einer Maus und (B) zwei Mäusen.

3.2.2.3. Laufbandtraining

Für das Trainingsexperiment wurden die acht Mäuse (#109 - #116) in zwei Gruppen eingeteilt. Vier Mäuse (#109, #110, #115, #116) wurden nach dem Zufallsprinzip der Gruppe der Nichtläufer und die übrigen vier Mäuse (#111 - #114) der Gruppe der Läufer zugeteilt. Das

durchgeführte Laufbandtraining fand auf Grund der physiologischen Nachtaktivität der Tiere innerhalb der Dunkelphase statt. Nach einer Eingewöhnungszeit von einer Woche wurde mit dem eigentlichen Trainingsexperiment im Alter von acht Wochen begonnen. Das Laufbandtraining wurde wie in Abb. 4 dargestellt durchgeführt.

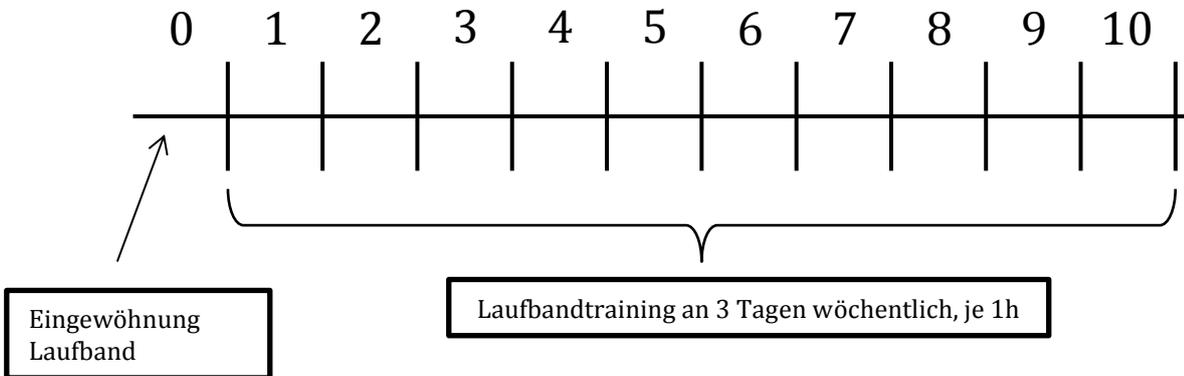


Abb. 4: Schematische Darstellung des Laufbandtrainings von Woche 1-10 mit einer Eingewöhnung von einer Woche.

In der Eingewöhnungswoche wurden die Mäuse der Läufergruppe an die Geräusche, die neue Umgebung und das Laufen auf dem Laufband gewöhnt, ohne ein Training im eigentlichen Sinne zu absolvieren. Dazu wurden die Tiere zunächst für einige Minuten auf das ausgeschaltete Laufband bei 0° Steigung gesetzt. Nachdem keine Stressreaktionen wie Fluchtversuche, Stressputzen etc. bei den Tieren mehr zu erkennen waren, wurde das Laufband eingeschaltet (siehe Tabelle 3).

Eingewöhnung (Woche 0)	Zielgeschwindigkeit	Steigung	Zeitdauer	Volle Geschwindigkeit
Tag1	8cm/s	0°	10min	nach 2min
Tag2	14cm/s	5°	20min	nach 5:30min
Tag 3	20cm/s	5°	30min	nach 10min

Tab.3: Aufgelistet sind Geschwindigkeit, Steigung und Zeitdauer des Laufbandtrainings in der Eingewöhnungswoche.

Die Startgeschwindigkeit betrug dabei jeweils 5cm/s und wurde nach und nach bis auf die jeweilige Zielgeschwindigkeit gesteigert. Das eigentliche Laufbandtraining war wie folgt aufgebaut:

Training	Tag	Geschwindigkeit	Steigung	Zeitdauer	volle Geschwindigkeit
Woche 1	1	10cm/s	5°	60min	nach 10min
	3	12cm/s	5°	60min	nach 10min
	6	12cm/s	5°	60min	nach 10min
Woche 2	8	12cm/s	10°	60min	nach 10min
	10	14cm/s	10°	60min	nach 10min
	13	16cm/s	10°	60min	nach 10min
Woche 3	15	18cm/s	10°	60min	nach 10min
	17	19cm/s	10°	60min	nach 10min
	20	20cm/s	10°	60min	nach 10min
Woche 4	22	21cm/s	10°	60min	nach 10min
	24	22cm/s	10°	60min	nach 10min
	27	18cm/s	15°	60min	nach 10min
Woche 5	29	20cm/s	15°	60min	nach 10min
	31	22cm/s	15°	60min	nach 10min
und folgend	34	24cm/s	15°	60min	nach 10min

Tab. 4: Aufgelistet sind Geschwindigkeit, Steigung und Zeitdauer des Laufbandtrainings während der ersten fünf Wochen.

Nach Abschluss der fünften Trainingswoche war die Maximalgeschwindigkeit von 24cm/s bei 15° Steigung erreicht und wurde bis zum Ende des Laufbandtrainings beibehalten.

Am letzten Tag der Trainingswoche 7 wurde Maus #111 nach 24min durch einen Stopp des Laufbandes aus dem Training genommen. Maus #111 wirkte erschöpft und hatte sich auf das Laufband gesetzt. Nachdem Maus #111 in den Käfig gesetzt wurde, erholte sie sich schnell. Es war während des Trainings und auch danach keinerlei Lahmheit oder sonstige Auffälligkeit zu erkennen. Am nächsten Trainingstag nahm Maus #111 wie gewohnt am Training teil und zeigte keinerlei Auffälligkeiten.

3.2.2.4. Tötung und Präparation der Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Gewebe für nachfolgende Analysen präpariert:

- Muskelgewebe der Hinterextremitäten (*M. gastrocnemius*, *M. soleus*, *M. tibialis anterior*, *M. extensor digitorum longus*, *M. quadriceps*, *Mm. adductores*)
- Diaphragma
- Leber

- Herz
- gonadales Fettgewebe
- Tibia
- Blut

Die Mäuse wurden mittels Isofluran narkotisiert. Im Anschluss daran wurde den Tieren retrobulbär mittels einer Glaskapillare aus dem nasalen Augenwinkel beidseits Blut entnommen und die Narkose im Anschluss daran noch einmal vertieft. Nach Stillstand der Atmung wurde die Körpermasse der Tiere mittels Waage bestimmt und die nasoanale Länge ermittelt, um den Lee-Index (vgl. 3.2.6.5.) bestimmen zu können. Im Anschluss daran wurden die Tiere an der Halswirbelsäule disloziert und in Rückenlage die Präparation der Gewebe begonnen. Zunächst erfolgte eine Inzision der Haut auf Höhe des Bauchnabels. Der Schnitt wurde sowohl nach proximal bis Höhe *Apertura thoracis cranialis* als auch nach distal bis zum Penis erweitert (Abb.5).

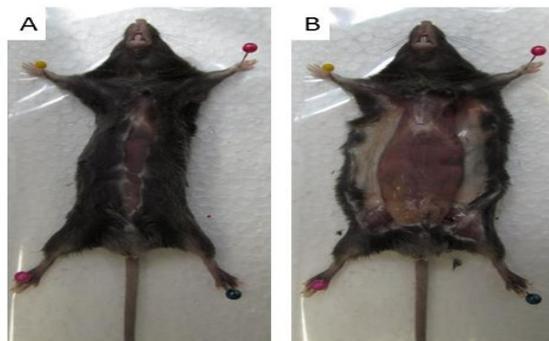


Abb.5: Hautschnitt (A) und Erweiterung der Schnittführung (B) im Zuge der Präparation.

Der Schnitt wurde im Anschluss auf Höhe der Extremitäten jeweils nach lateral erweitert und die Haut zur Seite geklappt. Für die Präparation der Muskulatur der Hinterextremität wurde der Schnitt an der medialen Seite des Oberschenkels nach distal bis auf Höhe der Metatarsalknochen verlängert und die Haut abpräpariert (Abb.6).



Abb.6: Präparation der Extremitätenmuskulatur an der rechten Hinterextremität im Zuge der Präparation.

Zunächst erfolgte die Präparation des *M. tibialis*, welcher cranial der Tibia aufsitzt. Dazu wurde dieser an seinem Ursprung von der knöchernen Unterlage getrennt, nach distal von der Tibia abgehoben und an seinem Ansatz abgetrennt. Als nächstes erfolgte die Präparation des *M. extensor digitorum longus*. Die Identifikation erfolgte mittels Zug an der Endsehne, woraufhin sich die Zehen nach cranial anheben. Der Muskel wurde an der Endsehne möglichst weit proximal auf Höhe des Tarsometatarsal-Gelenkes abgetrennt, nach proximal angehoben und an seinem Ursprung von der knöchernen Grundlage getrennt.

Für die Präparation der Muskulatur der Rückseite des Unterschenkels wurde die Extremität nach lateral gedreht und befestigt, sodass sich der *M. gastrocnemius* gut sichtbar darstellte. Dieser wurde an seiner Endsehne nahe dem *Tuber calcanei* abgetrennt, nach proximal angehoben und das Bindegewebe seitlich an den Muskelbäuchen entfernt. Unterhalb des *M. gastrocnemius* war dann dunkelrot der *M. soleus* zu erkennen. Dieser wurde mittels stumpfer Präparation vom *M. gastrocnemius* getrennt und an seinem Ursprung entfernt.

Als nächstes folgte die Präparation der Oberschenkelmuskulatur, wobei zunächst die *Mm. adductores* an Ansatz und Ursprung getrennt und entnommen wurden. Als letztes erfolgte die Entnahme des *M. quadriceps*, wobei von diesem lediglich die Anteile des *M. rectus femoris* und des *M. vastus medialis* entnommen wurden. Dazu wurde die Extremität wieder nach medial gedreht und befestigt, der *M. quadriceps* zunächst an seiner Endsehne von der Patella getrennt, nach proximal angehoben und soweit proximal wie möglich von seinem Ursprung getrennt. Die Präparation der zweiten Hinterextremität erfolgte analog zur ersten. Alle entnommenen Muskeln wurden sofort nach Entnahme in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Muskeln der rechten Extremität wurden dabei in RNA-Later überführt, gewogen, für 48h bei 4°C nach Anleitung gekühlt, um eine vollständige Infiltration des Gewebes mit RNA-Later zu gewährleisten, und im Anschluss bei -20°C für weitere Untersuchungen eingefroren. Die Muskulatur der linken Extremität wurde im Anschluss an die Gewichtsbestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nachfolgend an die Präparation der Muskeln wurden Diaphragma, Leber, Herz und das gonadale Fettgewebe präpariert. Dazu wurde das Peritoneum durch stumpfe Präparation von distal nach proximal in Richtung Sternum eröffnet und dieses mit einem Scherenschnitt durchtrennt. Der Brustkorb wurde analog zu den Entlastungsschnitten der Haut eröffnet, sodass sowohl der Situs des Abdomens als auch des Thorax sichtbar wurden (Abb.7).



Abb.7: Situs nach Entnahme der Muskulatur an der rechten Hinterextremität und Eröffnung des Peritoneums und Thorax.

Bei der weiteren Präparation erfolgte als erstes die Abtrennung der seitlichen Anteile des Diaphragmas von ihrer Anheftungsstelle am Brustkorb, sodass die *V. cava caudalis*, der *N. vagus* und der Ösophagus durch einen Schnitt getrennt werden konnten. Danach wurde die Leber von ihrer Unterfläche abgehoben, freipräpariert und im Ganzen entnommen. Es folgte die komplette Ablösung des Diaphragmas vom Brustkorb und dessen Entnahme. Nun konnte das Herz angehoben, die Aorta möglichst nah an der Herzbasis abgetrennt und so das Herz entnommen werden.

Als nächstes erfolgte die Entnahme der gonadalen Fettdepots. Dazu wurde der Schnitt in Richtung Skrotum erweitert, sodass das Fettdepot samt Hoden an die Oberfläche gelangte und im Ganzen entnommen werden konnte. Hoden und Nebenhoden wurden entfernt und das Fettdepot gewogen und gekühlt. Zum Schluss erfolgte die Entnahme der Tibia. Dazu wurden zunächst die verbliebenen Muskeln des Unterschenkels präpariert und im Anschluss die *Art. femorotibialis* sowie die *Art. tarsocruralis* disloziert, sodass Tibia und Fibula frei vorlagen. Nun wurde die Fibula von der Tibia getrennt, in 98% vergällten Ethanol überführt und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

Alle acht Mäuse wurden in genau derselben Reihenfolge und von der gleichen Person präpariert, um durch unterschiedliche Präparationsweisen verursachte Fehlerquellen auf ein Minimum zu reduzieren.

3.2.3. Proteinchemische Methoden

3.2.3.1. Herstellung von Histonproteinlysaten aus Zellen und aus Gewebe

Um Histonproteine aus kultivierten C2C12-Zellen aufzureinigen, wurden die Zellsedimente auf Eis aufgetaut, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Für die Isolierung der

Histonproteine aus C2C12 Zellen, sowie aus gefrorenen und ebenfalls auf Eis aufgetauten Muskelproben wurde das Total Histone Extraction *Kit* von Epigentek verwendet. Die Isolierung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

3.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Histonproben erfolgte mit einem Bradford-Assay. Dieser Assay wurde ausgewählt, da bei der Isolation der Histonproteine im verwendeten Puffersystem ein saurer Puffer verwendet wurde und das Bradford-Verfahren für saure Puffer geeignet ist. Hierfür wurde zunächst eine BSA-Standardreihe in Messpuffer (Puffer, in welchem sich die isolierten Histone nach der Aufreinigung befinden) in folgenden Konzentrationen hergestellt:

0,77mg/ml 0,60mg/ml 0,46mg/ml 0,35mg/ml 0,27mg/ml 0,21mg/ml 0,16mg/ml

Der Messpuffer besteht dabei zu gleichen Teilen aus BDTT-Puffer und Lysis-Puffer (aus Total Histone Extraction *Kit* von Epigentek). Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Microassay (Mikrotiterplatte, 96 Vertiefungen). Dazu wurden 5µl Proteinprobe und 250µl Nachweisreagenz (Bradford) in die Vertiefungen gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur 5min inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte dann bei 595nm mittels Tecan Reader. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen über die optische Dichte, den Verdünnungsfaktor und die Referenz-Standardwert-Kurve berechnet.

3.2.3.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Untersuchung der isolierten Histone wurden diese mit Hilfe einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Analyse wurden die jeweiligen Proteinlysate entsprechend einer Berechnung zum Erhalt von 10µg Protein für Gewebe und 5µg Protein für Zellen pro Geltasche mit 6,25µl 4xLaemmli-Puffer und der entsprechenden Menge Wasser gemischt, um jede Geltasche mit einem Gesamtvolumen von 25µl zu befüllen. Die Proben wurden für fünf Minuten im Heizblock bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und auf einem Gel von 1,0mm Dicke in vertikaler Richtung aufgetrennt. Die Gele bestanden aus einem Trenn- und einem sich daran nach oben anschließenden Sammelgel, in dem die Proteine vor der Aufreinigung fokussiert wurden. Bei allen Gelen wurde ein Molekulargewichts-Marker (*Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope, Biorad*) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann in 1xLaufpuffer bei 100V, 15W und 85mA, bis die Lauffront das Gelende bzw. die rote Protein-Markierung von 72 kDa das untere Drittel des Gels erreicht hatte.

Benötigte Stammlösungen:

3M Tris-HCl:

36,342g Tris wurden in max. 80ml ddH₂O gelöst, dann der pH-Wert mit HCl auf 8,8 eingestellt und auf 100ml aufgefüllt.

1M Tris-HCl pH 6,8:

12,1 g Tris wurden in max. 80ml ddH₂O gelöst, dann der pH-Wert mit HCl auf 6,8 eingestellt und auf 100ml aufgefüllt.

10% SDS:

10g SDS wurden in 8 ml ddH₂O gelöst, dann wurde auf 100ml aufgefüllt.

4xTrenngel (TG)-Puffer:

3M Tris-HCl pH 8,8	25ml
10%SDS	4ml
ddH ₂ O	21ml

4xSammelgel (SG)-Puffer:

1M Tris-HCl pH 6,8	25ml
10%SDS	4ml
ddH ₂ O	21ml

SDS-PAGE (Laemmli) für vier 1,0mm dicke Gele:

Zusammensetzung des Trenngels (12% Acrylamid)

40% Acrylamid-Mix (37,5:1)	9ml
(4x) Trenngel (TG)-Puffer	7,5ml
ddH ₂ O	13,5ml
TEMED	30µl
APS	150µl

Zusammensetzung des Sammelgels (6% Acrylamid)

40% Acrylamid-Mix (37,5:1)	2,4ml
(4x) Sammelgel (SG)-Puffer	4ml
ddH ₂ O	9,6ml
TEMED	20µl
APS	80µl

10xLaufpuffer / Elektrodenpuffer:

0,25M Tris	30,285g/l
0,192M Glycin	144,13g/l
1%SDS	10g/l

3.2.3.4. Immunologische Methoden

3.2.3.4.1. Western Blot

Bei der *Western Blot*-Analyse handelt es sich um einen quantitativen und qualitativen Nachweis von spezifischen Proteinen mittels Antikörpern. Dazu muss das zu untersuchende Proteinlysate zunächst mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.3.4.) aufgetrennt werden, um im Anschluss daran die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine adsorbierende Membran zu transferieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel elektrisch mit Hilfe einer *Semidry*-Blotapparatur auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Diese bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Hierzu wurden die Gele und die Membran, welche vorher einige Sekunden in Methanol aktiviert wurde, zunächst kurz in 1xBlotpuffer inkubiert. Auf die Anode des *Semidry-Blotters* wurden zwei in Blotpuffer angefeuchtete Filterpapiere luftblasenfrei aufeinander geschichtet, auf welche dann zuerst die Membran und dann das Gel gelegt wurden. Auf diese wurden ebenfalls zwei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere geschichtet und die Kathode gelegt. Der elektrische Transfer erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde bei einer Stromstärke von 1mA/cm², was bei zwei Minigelen ca. 15mA entspricht. Die Membranen wurden im Anschluss an den Transfer kurz in PBS gewaschen und bei 4°C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

1x Blotpuffer:

10ml 10xBlotpuffer
20ml Methanol
70ml ddH ₂ O

10x Blotpuffer:

390mM Glycin
480mM Tris
0,37%SDS

3.2.3.4.2. Inkubation mit Antikörpern

Um die relevanten Histonproteine darzustellen, wurden spezifische Antikörper zur Detektion verwendet. Dazu wurden die Membranen zunächst mit Methanol aktiviert, in 1xTBS gewaschen

und im Anschluss mit einer 5%igen Milchlösung (5% Milchpulver in 1xTBS mit 0,1%Tween 20) 60min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem verdünnten Primär-AK in 5%Milch (s.o.) über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4°C. Sämtliche folgenden Inkubationsschritte erfolgten dann auf einem Schüttler bei Raumtemperatur:

3x10min	waschen in 1xTBS mit 0,1%Tween 20
1h	Inkubation mit Sekundär-Antikörper (geeignet verdünnt in 5% Milch)
3x10min	waschen in 1xTBS mit 0,1%Tween 20

3.2.3.4.3. Detektion der Antikörper

Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit Hilfe eines enzymgekoppelten Sekundär-Antikörpers (s.o.). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren das mit dem Enzym *Horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelte Antikörper, welches die Oxidation von Luminol katalysiert. Diese Reaktion wurde auf der Membran durch Zugabe des *Westernbright* Chemilumineszenz Substrat *für Film* nach Angaben des Herstellers ausgelöst. Die Lichtemission konnte durch das Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden, wobei die Belichtungsdauer je nach Signalstärke zwischen einer Sekunde und einer Minute betrug.

3.2.3.4.4. MemCode Reversible Protein Stain Kit

Die MemCode-Methode stellt ein sensitives Verfahren zum Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen dar. Somit kann zum einen überprüft werden, ob der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgreich war, andererseits kann aber auch eine Quantifizierung der zu untersuchenden Proteine erfolgen. Eine MemCode-Färbung wurde auf allen für diese Arbeit angefertigten Membranen nach Protokoll des Herstellers im Anschluss an die Inkubation der Membranen mit dem als Ladekontrolle verwendeten anti-alpha-Tubulin-Antikörper angefertigt. Die Membranen wurden anschließend bei 4°C gelagert.

3.2.3.5. Mouse XL Cytokine Array Kit

Der *Mouse XL Cytokine-Array* stellt eine schnelle, sensitive Methode dar, um eine Vielzahl (111) an Proteinen (Chemokine, Cytokine und Wachstumsfaktoren) auf einer Membran nachzuweisen. Das zugrunde liegende Prinzip ist ein Sandwich-ELISA, wobei für jedes der zu untersuchende Proteine ein *capture*-Antikörper auf der Membran fixiert ist. Wird das Proteinlysate (hier Serum-Probe) auf die Membran gegeben, kommt es zu einer spezifischen Bindung der Antikörper an

ihre Zielproteine. Durch Waschen der Membran werden ungebundene Proteine entfernt, sodass der Sekundärantikörper und das Nachweiszym (biotinylierter *detection*-Antikörper plus Streptavidin-HRP) an das Bindungspaar Primärantikörper-Zielprotein binden können. Nach Zugabe eines Substrates, welches von HRP unter Chemilumineszenz umgesetzt wird, kann die Menge des gebundenen Proteins quantifiziert werden. Der *Cytokin-Array* wurde nach Protokoll des Herstellers (R&D Systems) durchgeführt.

3.2.4. Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1. Allgemeine Richtlinien zum Arbeiten mit RNA

Um zu verhindern, dass es zu einer Degradation der RNA durch Ribonuklease kommt, wurden verschiedene Sicherheitsmaßnahmen ergriffen. Ribonukleasen kommen ubiquitär vor, sodass bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen wurden und nur sterile, autoklavierte Pipettenspitzen und Plastikgefäße verwendet wurden.

3.2.4.2. Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Fettgewebe

Die Isolierung der gesamtzellulären RNA aus gonadalem Fettgewebe erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Lipid Tissue Minikit* nach dem Protokoll von Qiagen.

3.2.4.3. Bestimmung von RNA-Konzentrationen

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Als Referenzwert wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280nm bestimmt.

3.2.4.4. Umschrieb von RNA in cDNA

Für die Generierung von cDNA wurden 0,5µg der isolierten RNA mit 0,5µl Random Primer mit der entsprechenden Menge nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14µl gebracht und für 5min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz 5min auf Eis gestellt und danach bei 4°C abzentrifugiert. Der Probe wurde daraufhin folgender Mastermix zugegeben:

M-MLV RT 5x-Buffer	5µl
dNTPs	1,25µl
nukleasefreies Wasser	3,75µl
MULV	1µl

Die Synthese der cDNA erfolgte dann mittels folgender Inkubationsschritte:

10 Minuten 25°C	(<i>Random-Primer-Annealing</i>)
60 Minuten 50°C	(Synthese der cDNA am Temperatur-Optimum der Reversen Transkriptase)
15 Minuten 70°C	(Enzyminaktivierungn / Denaturierung Enzym)

Die so gewonnene cDNA wurde abzentrifugiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.4.5. Semi-quantitative *Realtime* Polymerasekettenreaction (qRT-PCR)

Das Prinzip der semi-quantitativen qRT-PCR besteht in der Detektion eines proportional entstehenden Fluoreszenzsignals während der Amplifikation eines PCR-Produktes. Bei diesem Verfahren wird die emittierte Fluoreszenz während jedes Zyklus' detektiert, der die Vermehrung der Ziel-DNA-Sequenz während der exponentiellen Phase der PCR widerspiegelt. So kann der Vergleich der Zielsequenz zwischen verschiedenen Proben erfolgen (relative Quantifizierung). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Generierung des Fluoreszenzsignals der EvaGreen-Mix eingesetzt, welcher einen unspezifisch in doppelsträngige DNA interkalierende, fluoreszierenden Farbstoff enthält.

Der PCR-Mix pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte sah folgendermaßen aus:

cDNA 0,25µl

Primer-Mix 3µl

EvaGreen RT Mix 7,5µl

Zur Amplifikation wurde folgendes Zeit-Temperatur-Protokoll angewandt:

95°C für 30s (Enzymaktivierung)

40 Zyklen à

95°C für 5s (Denaturierung)

59°C für 15s (*Annealing* & Elongation)

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätsüberprüfung der PCR-Produkte (69-95°C).

Unter dem *threshold cycle* (Ct) versteht man jenen Zyklus, bei welchem zum ersten Mal die Mindestmenge an amplifizierten Produkten vorhanden ist, bei denen ein Fluoreszenzsignal erzeugt werden kann. Daher kann über den Ct-Wert die cDNA-Menge der verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. Bei einem hohen Ct-Wert war dabei in der ursprünglichen Probe eine geringe Zahl an cDNA-Kopien der Zielsequenz vorhanden.

Verwendet man die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (nach Pfaffl), so werden als Kontrolle Referenzgene (*Housekeeping*-Gene) mit amplifiziert. *Housekeeping*-Gene sollten ubiquitär und weitgehend konstant exprimiert werden. Mit Hilfe des geometrischen Mittels der drei *Housekeeping*-Gene TBP, GAPDH und HPRT wurden im Rahmen dieser Arbeit die Ct-Werte auf eine gleiche Ausgangsmenge an cDNA mit folgender Formel normalisiert:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Probe}} - \text{Ct}_{\text{Housekeeping}}$$

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

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

3.2.5. Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden als Excel-Files angelegt (Microsoft Office Excel 2007). Auf Grund des Typs der Messwerte (physiologische und molekularbiologische Daten) konnte für alle Werte eine Normalverteilung angenommen werden. Die Varianzhomogenität der untersuchten Daten wurde mittels F-Test bestimmt. Darauffolgend wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert kleiner 0,05 angenommen.

3.2.6. Bestimmung von physiologischen Parametern

3.2.6.1. Gewichtsbestimmung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse (C57BL/6N, männlich) wurden zum Trainingsbeginn im Alter von acht Wochen das erste Mal gewogen, um ein Startgewicht zu ermitteln. Während des Trainings wurde das Gewicht wöchentlich immer am selben Tag und zur selben Uhrzeit bestimmt und notiert, um die Gewichtszunahme und somit eine Gewichtskurve ermitteln zu können. Die Bestimmung des Endgewichtes erfolgte am Tag der Präparation im Alter von 18 Wochen nach durchgeführtem Genickbruch.

3.2.6.2. Herzfrequenzmessung

Die Messung der Herzfrequenz mittels PhysioSuite® stellt eine schnelle, nicht-invasive Möglichkeit dar, die Herzfrequenz von Mäusen zu bestimmen. Das Modul MouseSTAT misst dabei die Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz, Perfusion und Atemfrequenz. Zur Messung der Herzfrequenz wird den Mäusen dabei 3cm proximal ein Sensor über die Schwanzspitze geschoben (Abb.8).



Abb.8: PhysioSuite Messgerät (A), Messung an der Schwanzspitze (B), Sensor (C).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der Herzfrequenz bei allen acht Mäusen einen Tag nach Ende des Trainingsexperimentes durchgeführt. Bei jeder Maus wurden insgesamt fünf Messungen direkt hintereinander, nach einer kurzen Gewöhnung an den angebrachten Sensor, durchgeführt. Die Messungen wurden alle von derselben Person durchgeführt.

3.2.6.3. Kraftmessung

Die Bestimmung der *Grip Strength* stellt einen einfachen, nicht-invasiven Test dar, um die Muskelkraft der Maus *in vivo* zu bestimmen. Man macht sich dabei das natürliche Verhalten der Maus zu Nutze, welche, wenn sie am Schwanz in die Höhe gehalten wird, nach etwas zu greifen versucht. Bei der *Grip Strength*-Messung wird dabei ein Metallgitter verwendet, welches an einen Kraftumwandler angeschlossen ist, der die Kraft, die durch den Zug am Gitter ausgeübt wird, darstellt. Die Kraft kann sowohl an der Vorderextremität als auch an Vorder- und Hinterextremität kombiniert gemessen werden (Abb.9).

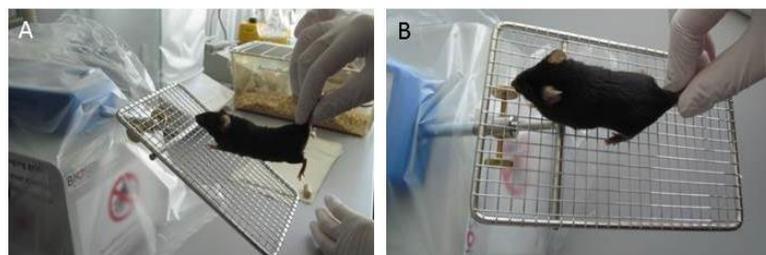


Abb.9: *Grip Strength*-Messung der isolierten Vorderextremität (A) und der Kombination Vorder- und Hinterextremität (B).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der *Grip Strength* im Rahmen des Trainingsexperimentes insgesamt viermal mit jeweils fünf Messungen durchgeführt. Die erste Messung fand zu Beginn der zehnten Trainingswoche und die weiteren Messungen im weiteren Verlauf dieser Trainingswoche statt. Die Messungen wurden jeweils im Anschluss an das Training von der gleichen Person durchgeführt.

3.2.6.4. Längenmessung

Die Messung der nasoanalen Länge stellt eine Methode der Längenbestimmung von Mäusen dar. Hierbei wird die Länge von der Nasenspitze bis zum Anus gemessen. In der hier vorgestellten Arbeit wurde bei allen acht untersuchten Mäusen im Anschluss an die Blutentnahme die Narkose nochmals vertieft und vor dem anschließend durchgeführten Genickbruch mit Hilfe einer Schieblehre die nasoanale Länge ermittelt.

3.2.6.5. Körperfettbestimmung/Lee-Index und Gewichtsbestimmung des gonadalen Fettdepots als Maß für den Gesamtkörperfettanteil

Der Lee-Index (Lee et al., 1929) wird für die Bestimmung von Übergewicht bei Nagetieren verwendet. Er dient häufig als indirektes Maß für den Körperfettanteil. Der Lee-Index bietet gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass er beim lebenden Tier gemessen werden kann. Für die Berechnung des Lee-Indexes werden das Körpergewicht (in Gramm) und die nasoanale Länge (in mm) benötigt:

$$\text{Lee-Index} = \text{Gewicht (g)}^{0.33} / \text{nasoanale Länge (mm)}$$

Als alternatives Maß für den Körperfettanteil wurde das Gewicht der gonadalen Fettdepots (Oztasan et al., 2007) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür von allen acht untersuchten Mäusen im Rahmen der Präparation die beiden gonadalen Fettdepots entnommen und in RNA-Later überführt. Anschließend wurden sie sowohl einzeln als auch zusammen gewogen und der Korrelationskoeffizient in Bezug auf das Körpergewicht nach Bravais/Pearson berechnet.

3.2.6.6. Knochenvermessung

Die rechte Tibia wurde im letzten Präparationsschritt mittels Absetzen im Knie- und Sprunggelenk mit Durchtrennung der Kollateral- und Kreuzbänder von der Extremität gelöst und in absoluten Ethanol bis zur osteometrischen Vermessung eingelegt. Für die osteometrische Vermessung der rechten Tibia wurden fünf Messstrecken gemäß der Arbeit von Driesch (1976) festgelegt (Abb.10):

- GL - die größte Länge der Tibia, gemessen von der *Eminentia intercondylaris* bis zum *Malleolus medialis* als distalstem Punkt
- BP - die größte Breite proximal, gemessen in transversaler Richtung zwischen den Medial- und Lateralrändern der beiden Kondylen
- BD - die größte Breite distal, gemessen in transversaler Richtung vom *Malleolus medialis* zur *Incisura fibularis tibiae*

- TD - die größte Tiefe distal, gemessen an der Stelle der größten Cochleabreite in sagittaler Richtung
- KD 50% - die kleinste Breite der Diaphyse, gemessen in transversaler Richtung auf exakt halber Höhe der GL

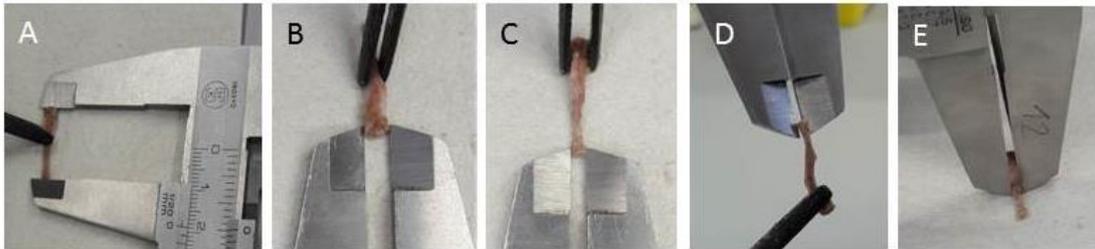


Abb.10: Dargestellt ist die Messung der Parameter GL (A), BP (B), BD (C), TD (D) und KD50% (E).

Die Vermessung der Tibia erfolgte mit Hilfe einer Schieblehre.

3.2.6.7. Herzvermessung / Herzgröße und Herzgewicht

Für die Bestimmung der Herzgröße und des Herzgewichtes wurden im Rahmen der Präparation die Herzen aller acht Mäuse entnommen, in RNA-Later eingelegt und gewogen. Im Anschluss wurde das Gesamtorgan mit Hilfe einer Schieblehre vermessen. Dabei wurde sowohl die größte Länge (GL) von der Mitte der Herzbasis bis zur Herzspitze als auch die größte Breite (GB) auf Höhe der Ventilebene gemessen (Abb.11).

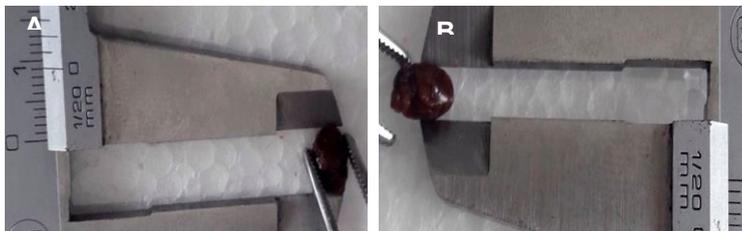


Abb.11: Messung der GL (A) und GB (B)

Nach der Messung wurden die Atrien von den Ventrikeln durch einen Schnitt auf Höhe der Ventilebene getrennt. Es wurde sowohl das Gewicht der beiden Atrien als auch der beiden Ventrikel zusammen bestimmt (Abb.12).



Abb.12: Blick auf die Ventilebene, nach Abtrennung der Atrien

Im Anschluss wurden sowohl die Dicke der rechten als auch der linken Ventrikelwand als auch die Dicke des Septums mit Hilfe einer Schieblehre bestimmt. Danach wurde zunächst der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel und dem Septum abpräpariert und gewogen und zudem auch das Gewicht des linken Ventrikels einschließlich Septum bestimmt.

3.2.6.8. Bestimmung des Gewichts einzelner Muskeln

Die Bestimmung der Masse individueller Muskeln sollte einen ersten Rückschluss auf mögliche hypertrophieinduzierende Wirkungen des zehnwöchigen Laufbandtrainings geben. Hierfür wurden ausgewählte Muskeln der Hinterextremität und der Brust, welche zudem für spätere Untersuchungen benötigt wurden, von den Gliedmaßen präpariert und anschließend in RNA-Later (Muskeln der rechten Extremität) bzw. in Stickstoff (Muskeln der linken Extremität) gelegt. Die Gewichtsbestimmung erfolgte durch Verrechnung mit dem Gewicht des vorgelegten RNA-Laters und / oder des Eppendorfgefäßes. Die Muskeln der linken Extremität wurden vor dem Einlegen in Stickstoff gewogen.

3.2.6.9. Lebergewicht und leberspezifische Parameter

Um den Einfluss des Trainingsexperimentes auf die Leber und die leberspezifischen Blutparameter zu untersuchen, wurde die Leber im Rahmen der Präparation im Ganzen entnommen, in RNA-Later eingelegt und gewogen. Verschiedene leberrelevante Parameter wurden zudem im Rahmen der blutchemischen Untersuchung (siehe 3.2.6.11.) aus dem Plasma bestimmt.

3.2.6.10. Gewichtsbestimmung und Aufarbeitung der gonadalen Fettdepots

Im Zuge der Präparation wurde bei allen acht Mäusen sowohl das rechte wie auch das linke gonadale Fettdepot entnommen und in RNA-Later eingelegt. Anschließend wurde das Gewicht

für jedes Fettdepot einzeln bestimmt (siehe 3.2.6.5.). In einem weiteren Schritt wurde das rechte gonadale Fettdepot für Untersuchungen auf RNA-Ebene verwendet. Hierfür wurde zunächst die RNA aus dem Fettgewebe nach Protokoll aufgereinigt (RNeasy Lipid Tissue Minikit) und anschließend qPCR-Analysen durchgeführt.

3.2.6.11. Blutanalyse und Cytokin-Array

Um den Einfluss des durchgeführten Trainingsexperimentes auf verschiedene Blutparameter zu untersuchen, wurde allen acht Mäuse nach Isofluran-Betäubung retrobulbär Blut für eine hämatologische und blutchemische Untersuchung abgenommen. Die Hämatologie wurde mittels *Animal Blood Counter* (scil), die Blutchemie mittels VetTest 8008 (Gesundheitsprofil Kleintier + Laktat) durchgeführt. Von vier Mäusen (zwei Läufer und zwei Nichtläufer) konnte zudem ein ausreichend gefülltes Serumröhrchen für eine Untersuchung des Zytokinprofils mittels *Zytokin-Array* gewonnen werden.

4. Ergebnisse

4.1. Physiologische Parameter

4.1.1. Gewichtsbestimmung

Die in dieser Arbeit verwendeten männlichen Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J wurden im Alter von acht Wochen in das Trainingsexperiment eingesetzt. Das Anfangsgewicht der Tiere zu Beginn des Experiments lag im Durchschnitt in der Gruppe der Nichtläufer bei 25,01g (+/- 0,69g), in der Gruppe der Läufer bei 24,15g (+/-1,91g). Das Endgewicht nach Abschluss des zehnwöchigen Experiments lag im Durchschnitt in der Gruppe der Nichtläufer bei 30,89g (+/- 1,53g), in der Gruppe der Läufer bei 29,85g (+/- 4,50g) (Abb.13).

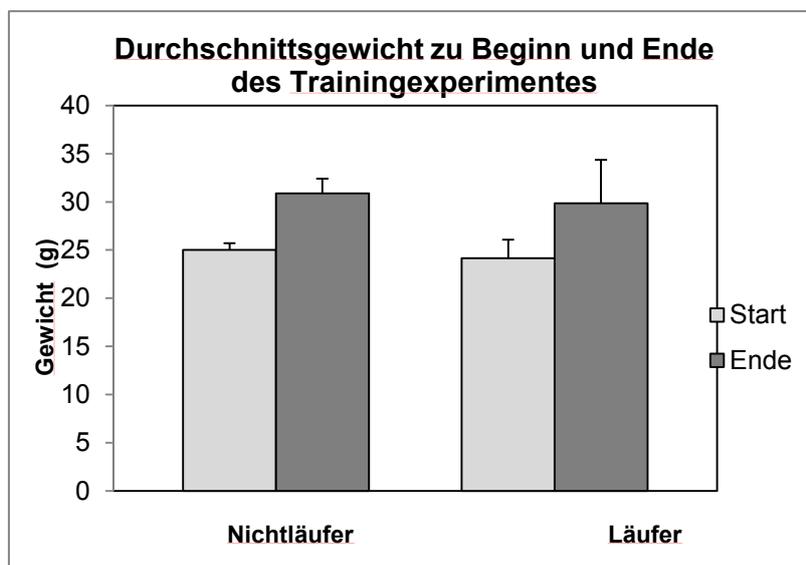


Abb.13: Darstellung der Durchschnitts-Körpergewichte in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer zu Beginn und zum Ende des zehnwöchigen Trainingsexperimentes.

Das Gewicht der Läufer war im Durchschnitt, wenn auch nicht signifikant, sowohl zu Beginn als auch am Ende des Experiments geringer als das der Nichtläufer. Die in der Gruppe der Läufer höhere Standardabweichung lässt sich auf die höheren Gewichtsunterschiede zwischen den untersuchten Mäusen, welche schon zu Beginn des Versuches bestanden hatten und auch im Verlauf des Trainingsexperimentes persistierten, zurückführen (Abb.14).

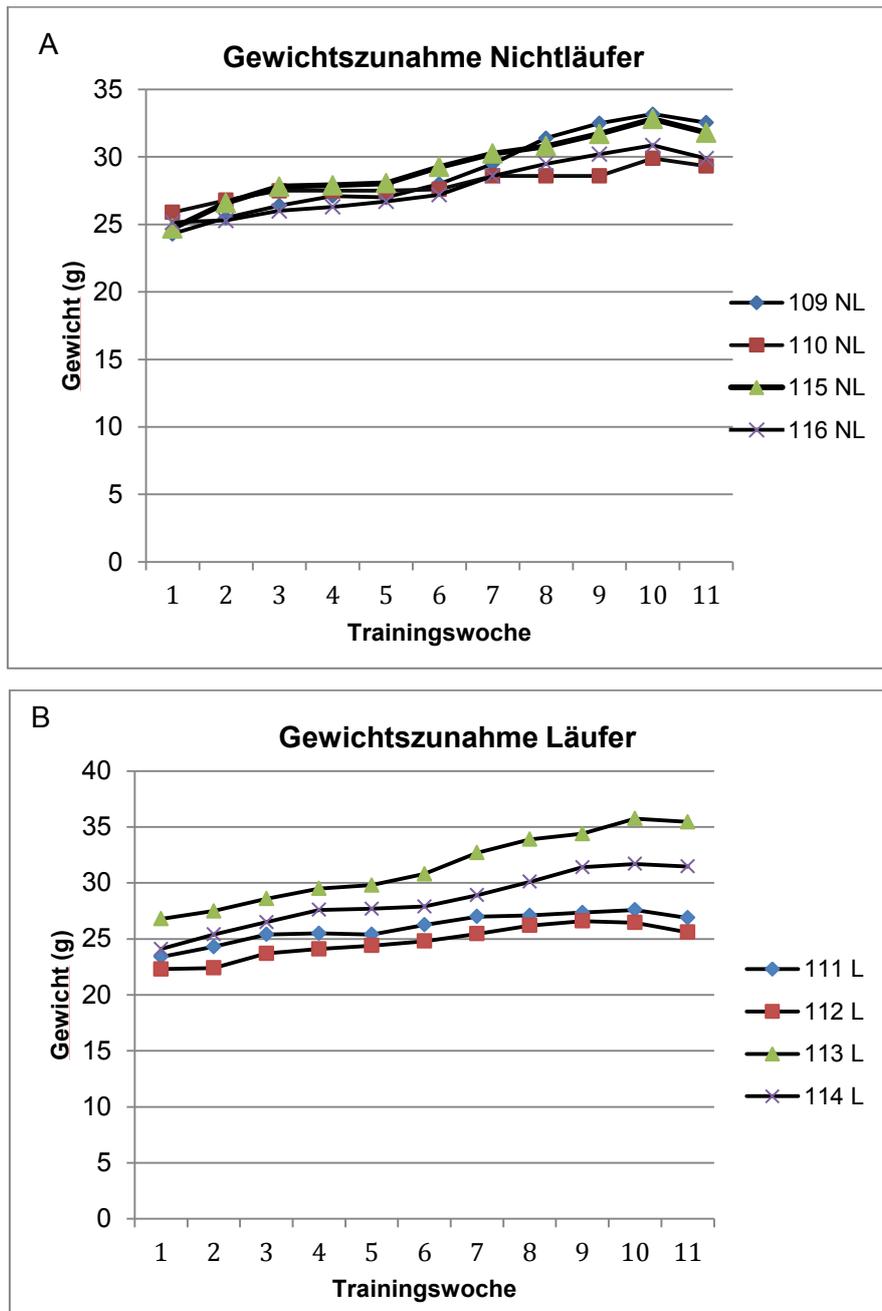


Abb.14: Dargestellt sind die Gewichtskurven der Nichtläufer (NL) (A) und der Läufer (L) (B) während des Trainingsexperimentes.

4.1.2. Herzfrequenzmessung

Um zu untersuchen, ob das durchgeführte Laufbandtraining einen Effekt auf die Ruhe-Herzfrequenz und damit die aerobe *Fitness* der Tiere hatte, wurde bei allen acht Mäusen eine entsprechende Messung im Anschluss an das Trainingsexperiment durchgeführt. Es wurden pro Tier jeweils fünf Einzelmessungen direkt hintereinander durchgeführt. Bei den Messungen zeigte

sich, dass die Mittelwerte bei allen Mäusen zwischen 500 und 700 Schlägen pro Minute lagen (Abb.15). Zwischen den einzelnen Messungen ergaben sich jedoch mitunter starke Schwankungen:

Maus Nr.	109	110	115	116	111	112	113	114
Gruppe	NL	NL	NL	NL	L	L	L	L
M 1	545	461	692	480	734	666	514	352
M 2	590	553	395	541	626	631	535	425
M 3	679	576	404	791	486	593	400	720
M 4	803	654	465	456	590	555	433	538
M 5	744	759	478	484	679	582	818	514
Mittelwert	672,2	600,6	486,8	550,4	623,0	605,4	540,0	509,8

Tab.5: Dargestellt sind die einzelnen Messergebnisse (M 1 - M 5) für die Herzfrequenz, sowie die jeweiligen Mittelwerte.

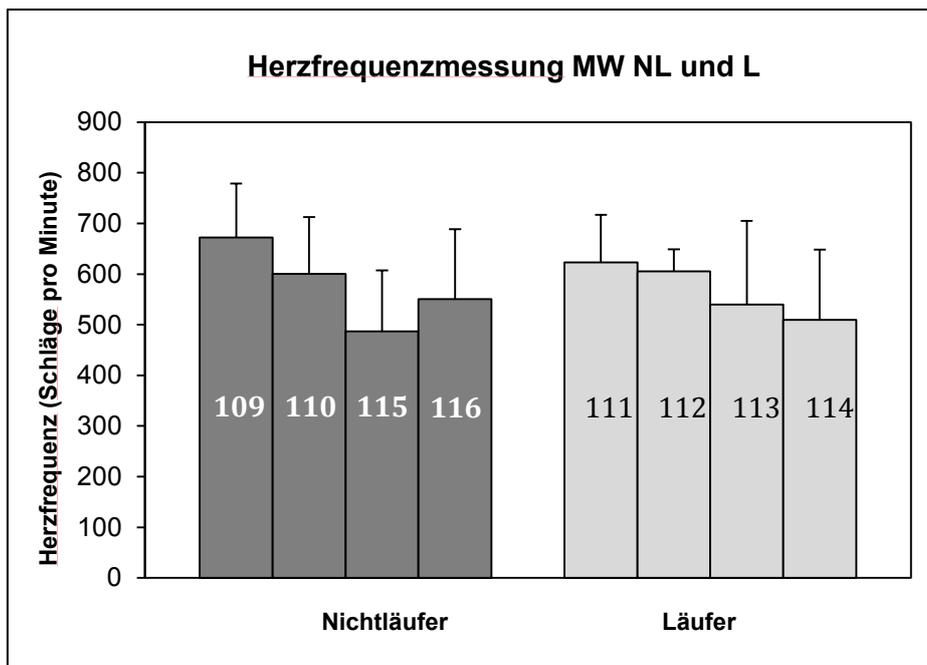


Abb.15: Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (MW) der Herzfrequenzmessungen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L). Die Nummern der Balken entsprechen der Nummerierung der Tiere.

Vergleicht man die Mittelwerte der Läufer und Nichtläufer, so sieht man in der Gruppe der Läufer eine geringe Tendenz zu einer Reduktion der Herzfrequenz. Diese war statistisch jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). In der Gruppe der Nichtläufer betrug die durchschnittliche Herzfrequenz 577,5bpm ($\pm 78,4$ bpm) und in der Gruppe der Läufer 569,6bpm ($\pm 53,5$ bpm) (Abb.16).

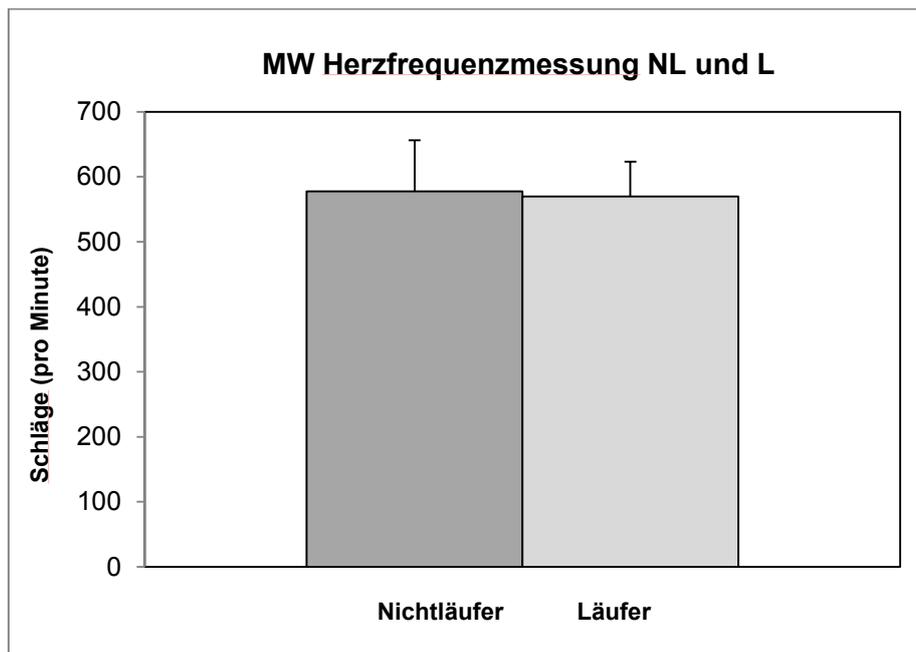


Abb.16: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Herzfrequenzmessung in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

4.1.3. Kraftmessung

Um zu untersuchen, ob das in dieser Arbeit durchgeführte Lauftraining einen Effekt auf die Muskelkraftentwicklung hatte, wurde bei allen acht Mäusen die Griffkraft (*Grip Strength*), mit der die Tiere ein angebotenes Gitter festhielten, wiederholt gemessen. Hierbei wurden sowohl Messungen für die Vorderextremität alleine als auch für Vorder- und Hinterextremität kombiniert durchgeführt. Die Messungen erfolgten zu Beginn der zehnten Trainingswoche, sowie im Verlauf der zehnten Trainingswoche (insgesamt vier Messungen) im Anschluss an das Training in Messserien zu jeweils fünf Tests. Dabei zeigte sich, dass die Kraft, welche von den Mäusen aufgewendet wurde, eine hohe Variabilität aufwies und mit jedem Messtag geringer wurde. Innerhalb der einzelnen Messserien ließ sich jedoch keine Tendenz in Bezug auf die Kraftentwicklung ableiten (Tab.6 / 7).

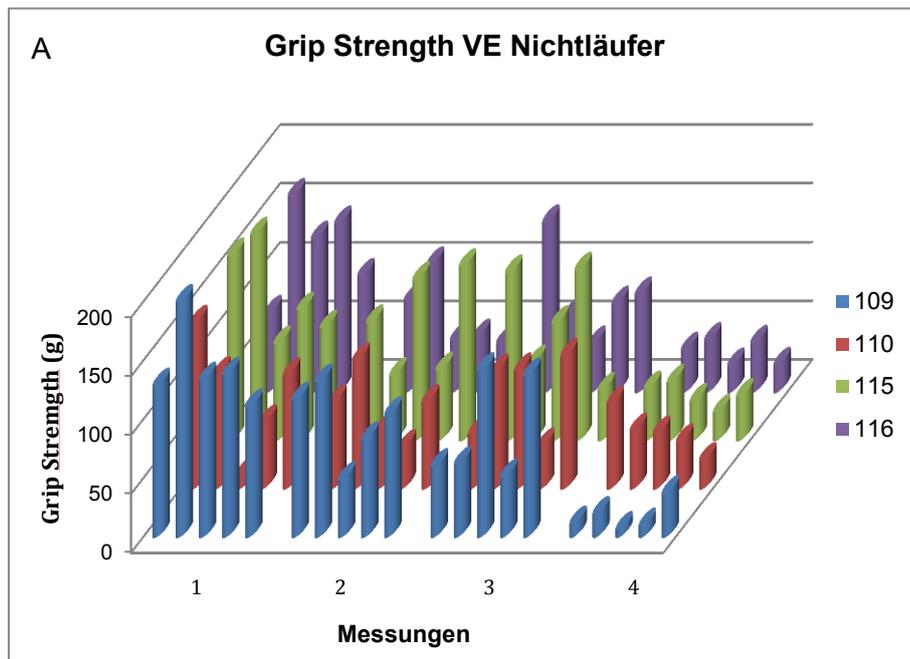
Messung	MW L (in g)	MW NL (in g)
1 (Tag 1 Woche 10)	115,43 (+/- 12,14)	120,08 (+/- 7,49)
2 (Tag 2 Woche 10)	61,95 (+/- 16,35)	82,59 (+/- 6,61)
3 (Tag 3 Woche 10)	83,765 (+/- 12,61)	88,03 (+/- 4,63)
4 (1 Tag nach dem letzten Training)	66,395 (+/- 21,24)	34,035 (+/- 3,49)

Tab.6: *Grip Strength*-Messung der Vorderextremität

Messung	MW L (in g)	MW NL (in g)
1 (Tag 1 Woche 10)	120,33 (+/- 11,73)	165,62 (+/- 9,33)
2 (Tag 2 Woche 10)	132,93 (+/- 7,39)	150,80 (+/- 18,25)
3 (Tag 3 Woche 10)	142,76 (+/- 15,01)	145,57 (+/- 16,24)
4 (1 Tag nach dem letzten Training)	137,16 (+/- 12,84)	132,06 (+/- 8,02)

Tab.7: *Grip Strength*-Messung der Vorder- und Hinterextremität kombiniert

Nachfolgend werden sowohl für die Gruppe der Nichtläufer, als auch für die Gruppe der Läufer, die an allen vier durchgeführten Messtagen erhobenen Werte für die isolierte Vorderextremität in einer Grafik dargestellt (Abb.17).



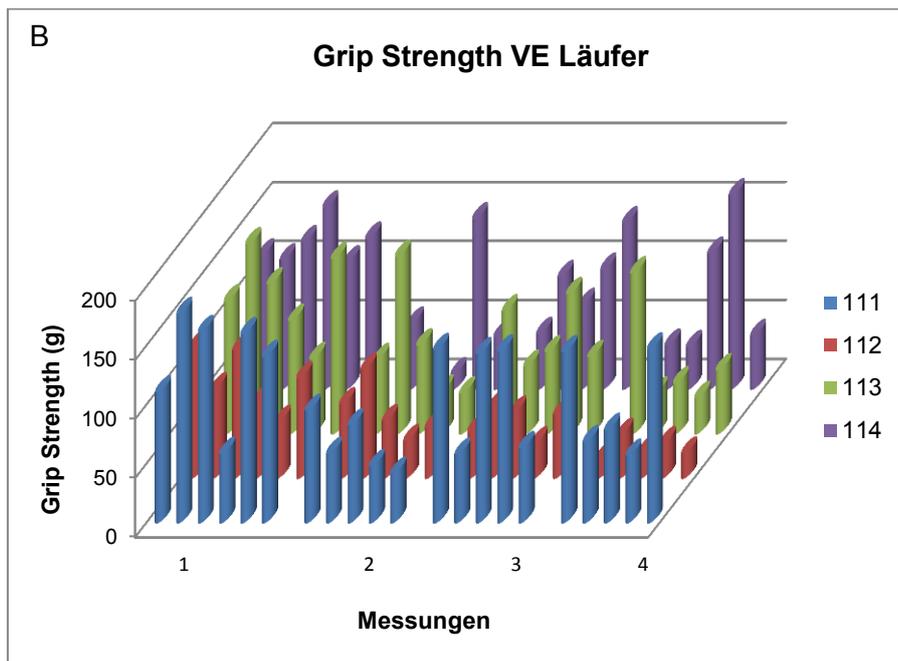


Abb.17: Darstellung der *Grip Strength* der isolierten Vorderextremität (VE) an den 4 Untersuchungstagen mit jeweils 5 Messungen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) (A) und der Läufer (L) (B).

4.1.4. Längenmessung

Um zu untersuchen, ob körperliches Training einen Effekt auf das Längenwachstum hat, wurde bei allen Mäusen die nasoanale Länge bestimmt. Die Bestimmung der nasoanalen Länge gibt nicht nur einen Hinweis auf eine mögliche Auswirkung von Ausdauertraining auf das Längenwachstum, sondern ist auch ein wichtiger Parameter für die Bestimmung des Lee-Indexes (siehe 4.1.5.). Die hier untersuchten Mäuse zeigten in der Gruppe der Nichtläufer eine mittlere nasoanale Länge von 79,7mm (+/- 0,38mm) und in der Gruppe der Läufer eine mittlere nasoanale Länge von 77,5mm (+/- 0,34mm) (Abb.18). Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Läufern und den Nichtläufern ($p > 0,05$).

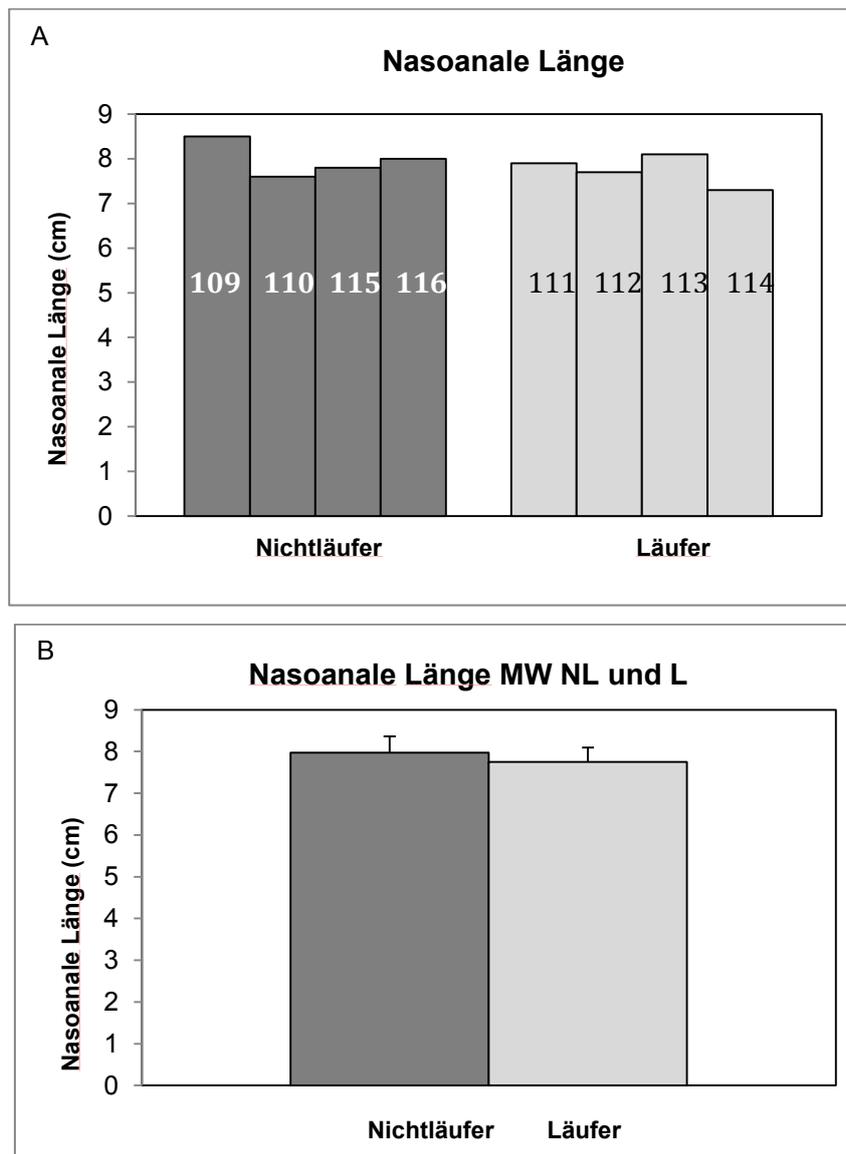


Abb.18: Dargestellt sind die nasoanale Länge der einzelnen Nichtläufer (NL) und Läufer (L) (A), sowie die Mittelwerte (MW) der nasoanal Länge in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer (B).

4.1.5. Körperfettbestimmung/ Lee-Index und Gewichtsbestimmung der gonadalen Fettdepots als Maß für den Gesamtkörperfettanteil

Um zu untersuchen, ob körperliches Training einen Effekt auf den Körperfettanteil hat, wurde für alle Mäuse der Lee-Index berechnet. Die untersuchten Mäuse zeigten in der Gruppe der Läufer einen mittleren Lee-Index von 0,039 (+/- 0,0024) und in der Gruppe der Nichtläufer von 0,038 (+/- 0,0014) (Abb.18). Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb.19).

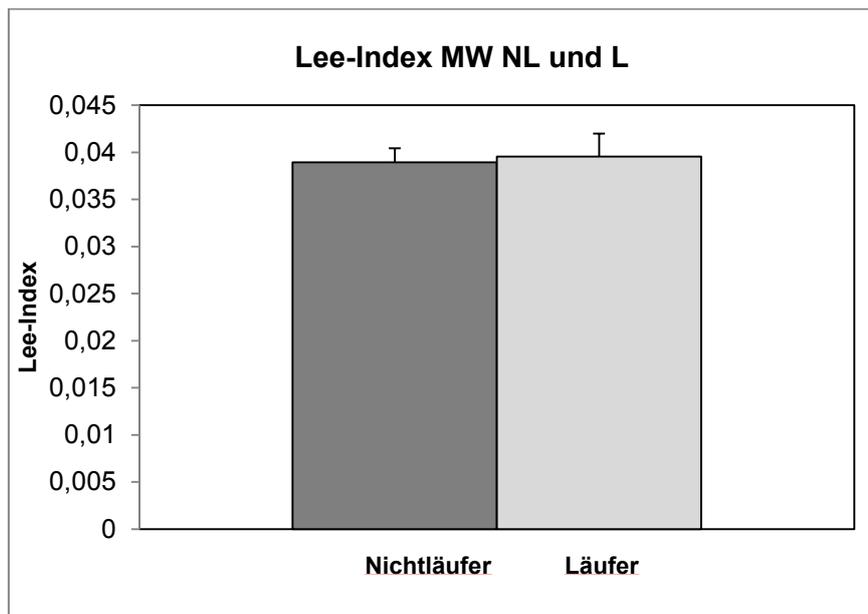


Abb.19: Mittelwerte (MW) des Lee-Indexes in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Auch das Gewicht der gonadalen Fettdepots in Relation zum Körpergewicht kann als Maß für den Gesamtkörperfettanteil herangezogen werden (Oztasan et al., 2007). In der vorliegenden Studie zeigten die Mäuse mit einem höheren Körpergewicht durchschnittlich auch ein höheres Gesamtgewicht der gonadalen Fettdepots.

Um diese Annahme zu untermauern, wurde der Korrelationskoeffizient für das Gesamtgewicht der gonadalen Fettdepots in Bezug auf das Körpergewicht berechnet. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Nichtläufer ein Koeffizient von 0,775 und in der Gruppe der Läufer einer von 0,829 (Abb.20). Ein Korrelationskoeffizient von $>0,70$ spricht für einen hohen Zusammenhang zwischen zwei Messgrößen (Burt et al., 1996). Diese Daten weisen daher auf eine gute Korrelation zwischen dem Gesamtgewicht der gonadalen Fettdepots und dem Körpergewicht in beiden untersuchten Tiergruppen hin.

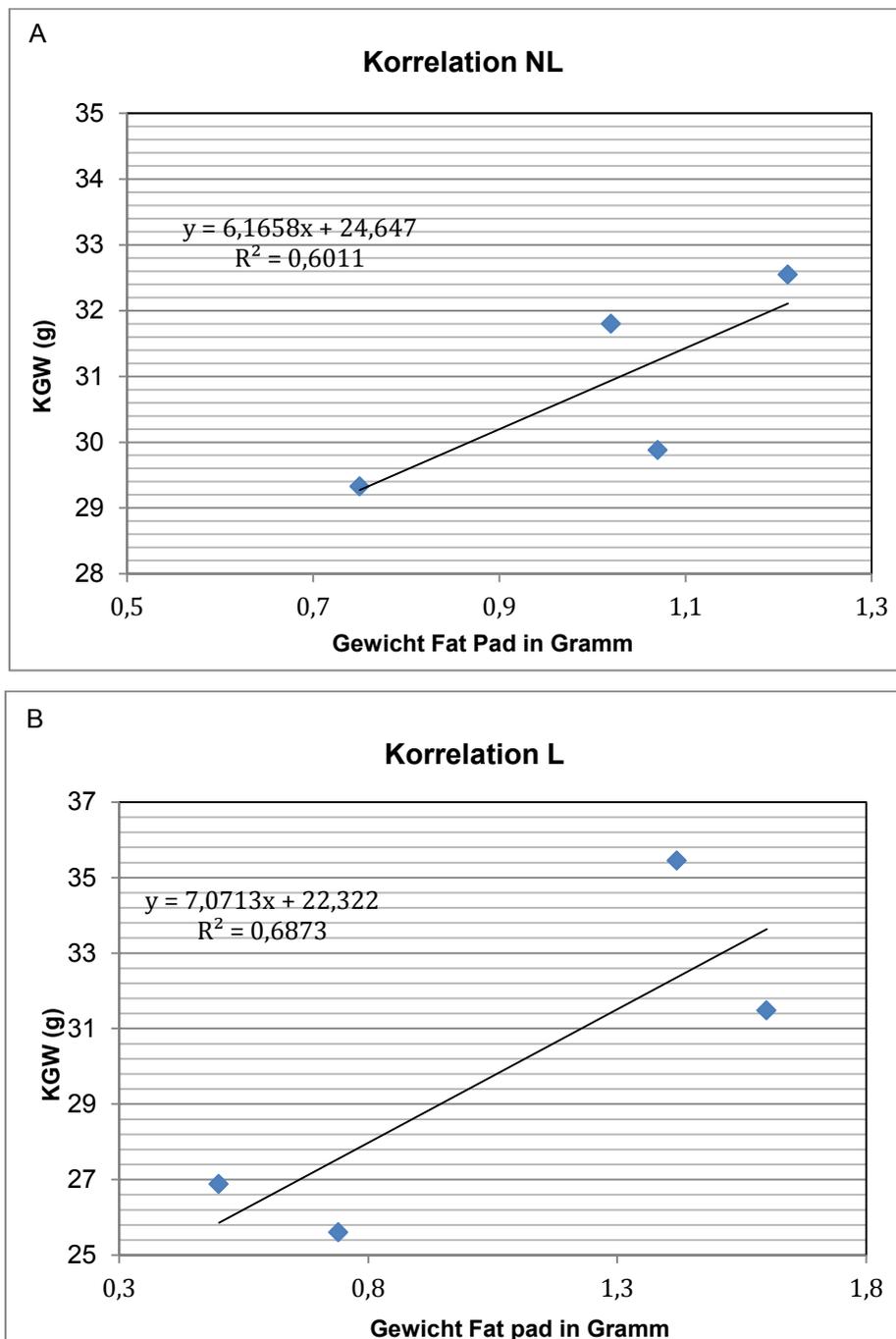


Abb.20: Dargestellt sind die Korrelationen des Körpergewichts zum Gewicht der gonadalen Fettdepots in den Gruppen der Nichtläufer (NL) (A) und der Läufer (L) (B).

Da Oztasan et al. (2007) insbesondere das Gewicht des linken gonadalen Fettdepots in Relation zum Gesamt-Körpergewicht als Maß für den Körperfettanteil herangezogen, wurde zusätzlich analysiert, ob körperliches Training zu einer Reduktion des Gewichts des linken gonadalen Fettdepots relativ zum Körpergewicht führt. Hierfür wurden jeweils die linken und rechten

Fettdepots einzeln gewogen. In Tabelle 8 sind das Gewicht des linken gonadalen Fettdepots und das Gesamtkörpergewicht aufgelistet:

Maus Nr.	109	110	115	116	111	112	113	114
Gruppe	NL	NL	NL	NL	L	L	L	L
Gewicht linkes gonadales Fettdepot (g)	0,59	0,36	0,19	0,36	0,68	0,66	0,47	0,53
Gesamt-Körpergewicht (g)	32,55	29,33	26,88	25,60	35,45	31,48	31,80	29,88

Tab.8: Dargestellt sind das Gewicht des linken gonadalen Fettdepots und das Gesamtgewicht der untersuchten Mäuse in Gramm.

Die Korrelation des Gewichts des linken gonadalen Fettdepots mit dem Körpergewicht ergab in der Gruppe der Nichtläufer einen Korrelationskoeffizienten von 0,688 und in der Gruppe der Läufer von 0,863, wohingegen die Korrelation des rechten gonadalen Fettdepots mit dem Körpergewicht in der Gruppe der Nichtläufer einen Korrelationskoeffizienten von 0,845 und in der Gruppe der Läufer von 0,776 ergab. In beiden Gruppen fand sich also eine gute Korrelation zwischen den Gewichten beider Fettdepots und dem Gesamtkörpergewicht (Abb.21).

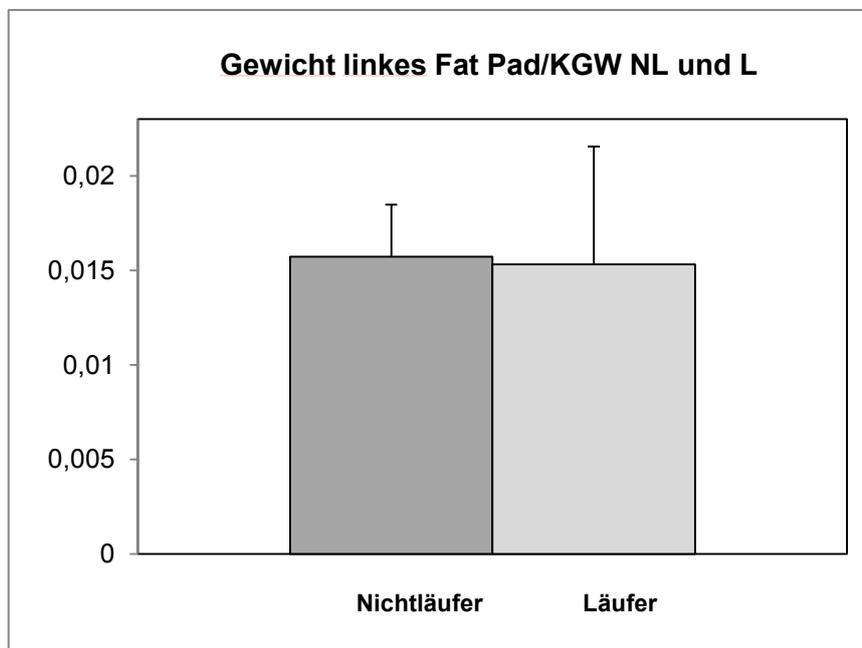


Abb.21: Dargestellt sind die Mittelwerte des Gewichts des linken gonadalen Fettdepots relativ zum Körpergewicht (KGW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

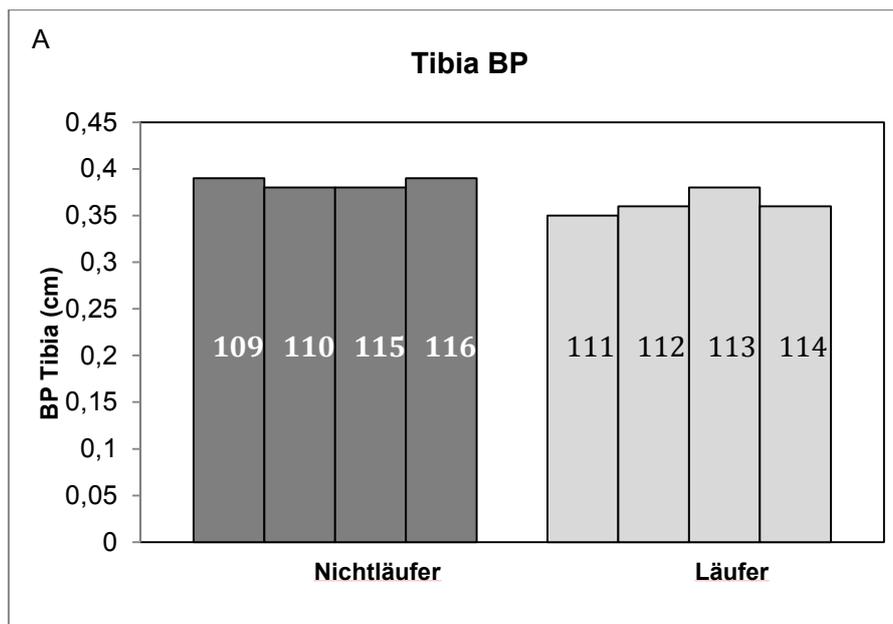
Tendenziell zeigte sich bei den Läufern eine leichte Reduktion im Gewicht des linken gonadalen Fettdepots relativ zum Körpergewicht. Dies deutet darauf hin, dass das Lauftraining zu einer Reduktion des Körperfettanteils führen könnte. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass das Lauftraining keinen Einfluss auf den Lee-Index und das Gewicht der gonadalen Fettdepots relativ zum Körpergewicht der Tiere hatte.

4.1.6. Knochenvermessung

Für die osteometrische Bestimmung wurde von allen acht in der Studie verwendeten Mäusen die rechte Tibia unter der Anwendung der vorher festgelegten Messstrecken einer osteometrischen Analyse unterzogen.

Sowohl für die BP als auch die KD50% zeigte sich zwischen der Gruppe der Nichtläufer und Läufer (jeweils $n=4$) ein signifikanter Unterschied. Die BP lag in der Gruppe der Nichtläufer im Durchschnitt um 0,02cm ($\pm 0,005$ cm) höher als in der Gruppe der Läufer (Abb.22).



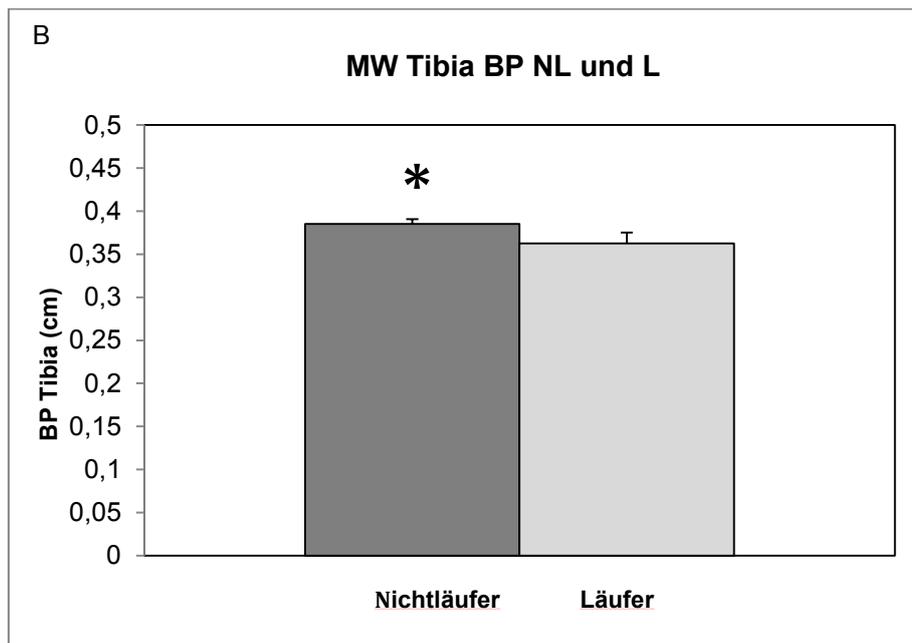
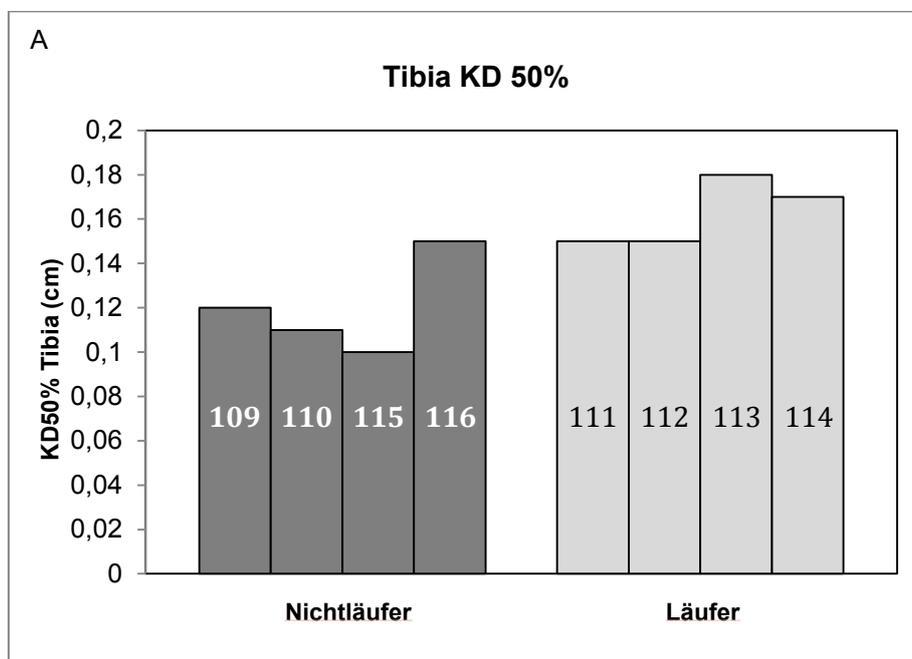


Abb.22: Darstellung der BP der rechten Tibia in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und Läufer (L) (A), sowie der Mittelwerte (MW) der BP der rechten Tibia (B) (* $p < 0,05$).

Die KD50% lag dagegen bei den Läufern im Durchschnitt um 0,04cm (+/- 0,015cm) höher als bei den Nichtläufern (Abb.23).



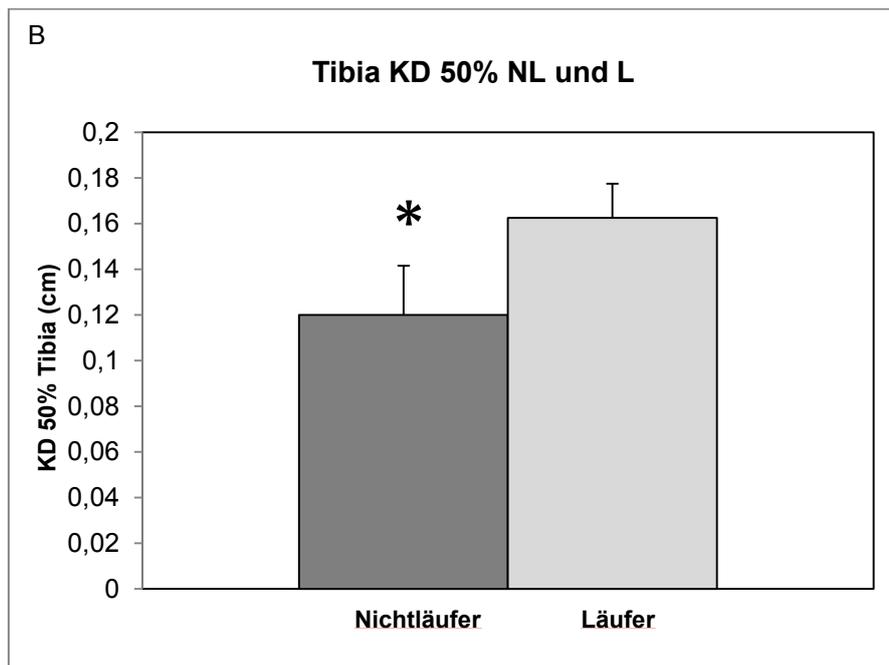


Abb.23: Darstellung der KD50% der rechten Tibia in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und Läufer (L) (A), sowie der Mittelwerte (MW) der KD50% der rechten Tibia (B) (* $p < 0,05$).

Die durchschnittliche GL lag in der Gruppe der Nichtläufer bei 1,88cm (+/- 0,08cm) und bei den Läufern bei 1,92cm (+/- +0,08cm). Dieser Unterschied erwies sich ebenso wie geringfügige Unterschiede in Bezug auf die Mittelwerte der BD und der TC zwischen Läufern und Nichtläufern als nicht signifikant.

4.1.7. Herzvermessung / Herzgröße und Herzgewicht

Um zu untersuchen, ob das durchgeführte Laufbandtraining einen Effekt auf die Herzgröße und Hypertrophie des Herzens besitzt, wurden sowohl das Herzgewicht als auch die Herzgröße bestimmt. Für das Herzgewicht zeigte sich in der Gruppe der Läufer eine Tendenz zur Reduktion. Hier lag das Gewicht bei 138,25mg (+/- 17,23mg) und in der Gruppe der Nichtläufer bei 153,48mg (+/- 17,51mg) (Abb.24). Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

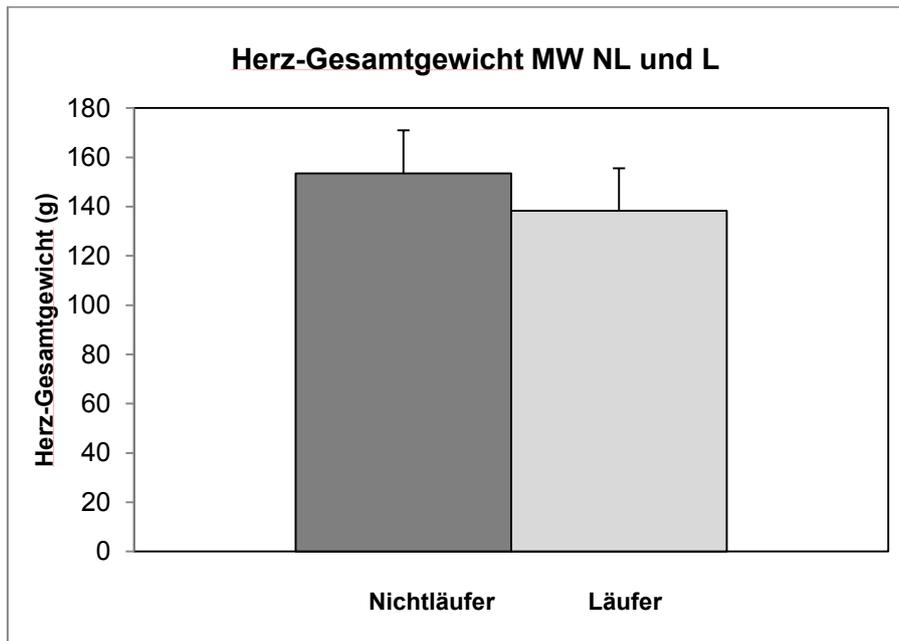


Abb.24: Dargestellt sind die Herzgewichte (Mittelwerte, MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Setzt man das Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht, so zeigt sich ebenfalls eine Tendenz zu Reduktion in der Gruppe der Läufer (Abb.25).

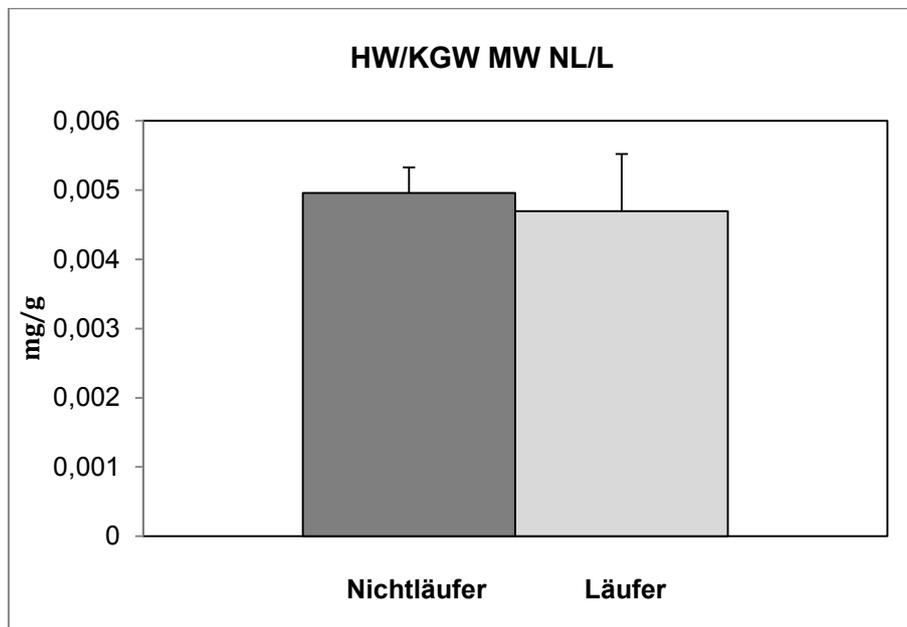


Abb.25: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des Herzgewichts (HW) in Relation zum Körpergewicht (KGW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Dabei fand sich sowohl eine Reduktion im Gewicht der Atrien als auch im Gewicht der Ventrikel in der Gruppe der Läufer (Abb.26). Diese war statistisch jedoch ebenfalls nicht signifikant ($p>0,05$).

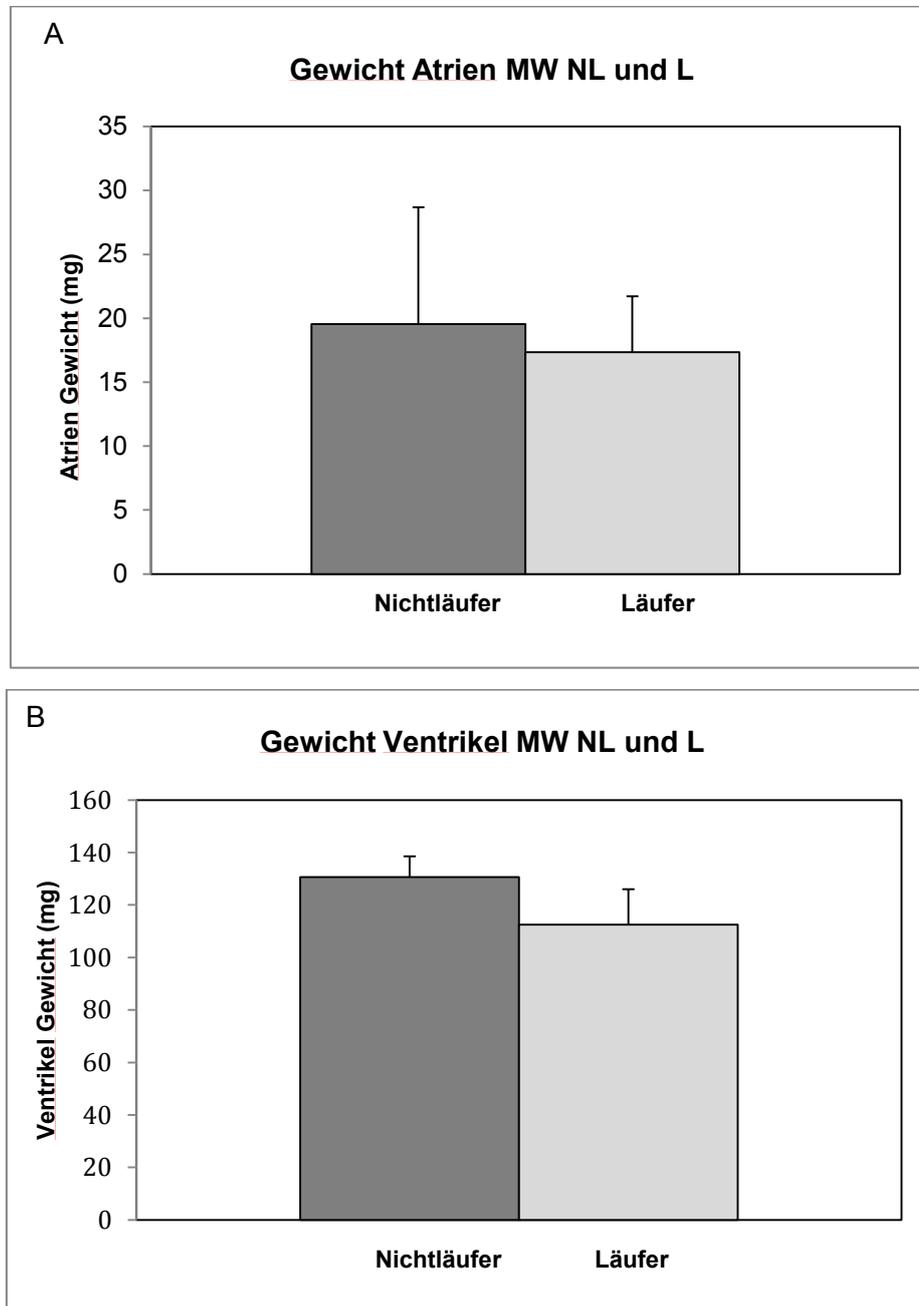


Abb.26: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Gewichte der Atrien (A) und der Ventrikel (B) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Bei der Gewichtsbestimmung der Ventrikel einzeln zeigte sich die Reduktion des Gewichts insbesondere in Bezug auf den rechten Ventrikel. Hier lag das Gewicht in der Gruppe der Nichtläufer bei 20,5mg (+/- 7,44mg) und in der Gruppe der Läufer bei 13,85mg (+/- 3,16mg) (Abb.27). Diese Unterschiede waren statistisch jedoch ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,05$).

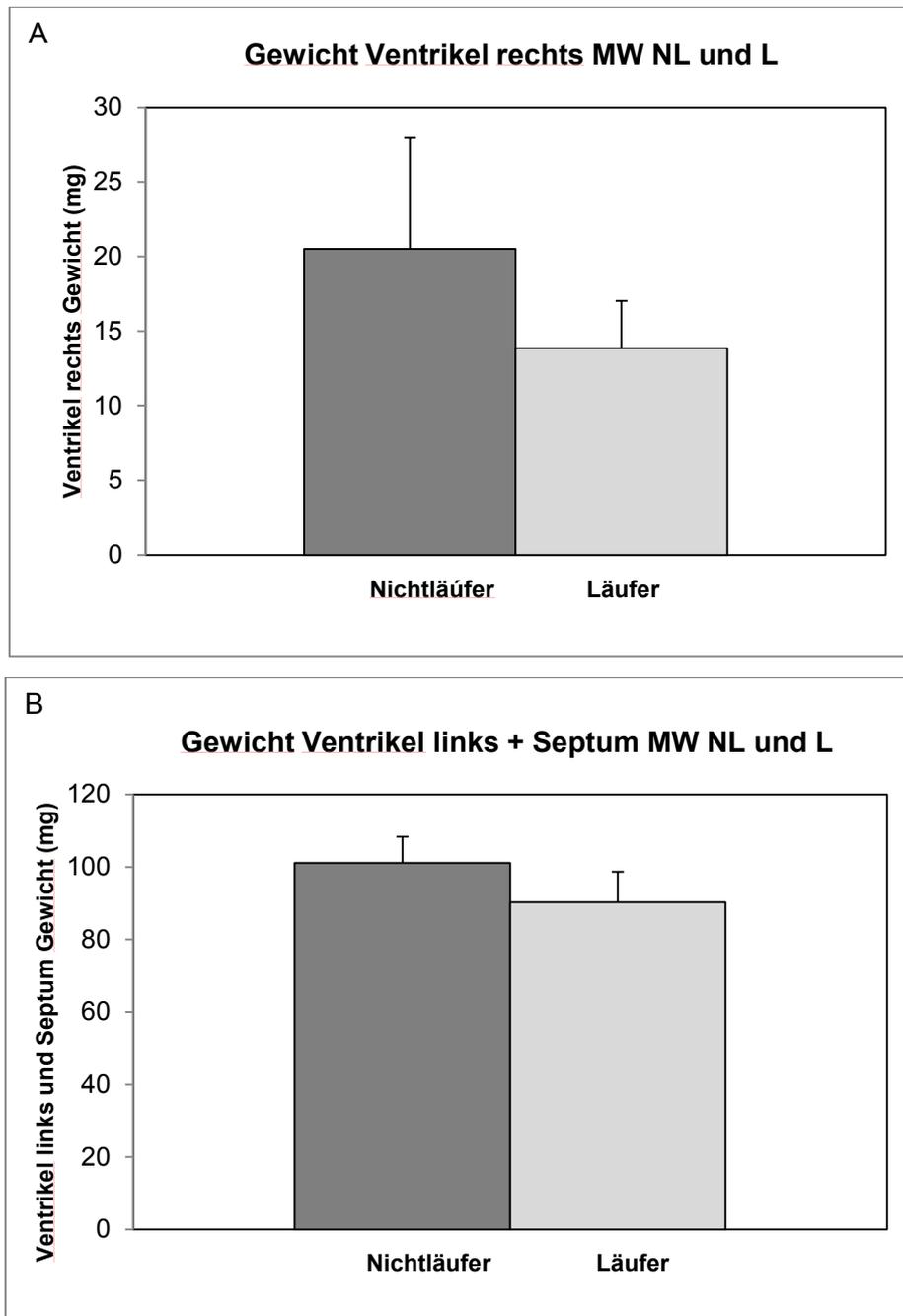


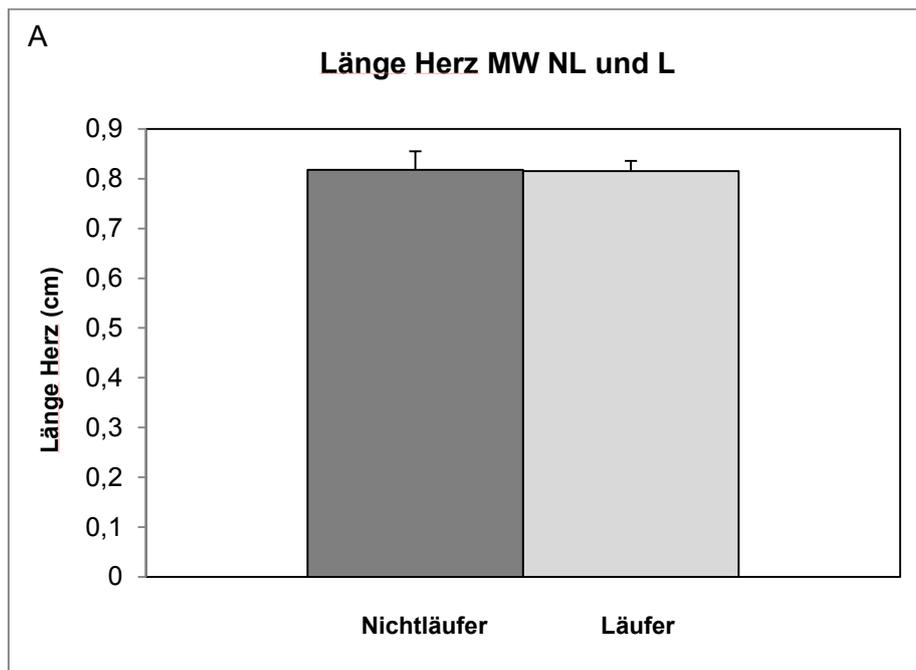
Abb.27: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Gewichte des rechten Ventrikels (A) und des linken Ventrikels mit Septum (B) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

In der nachfolgenden Tabelle sind die Gewichte der einzelnen Messungen für jede Maus aufgelistet:

Maus Nr.	109	110	115	116	111	112	113	114
Gruppe	NL	NL	NL	NL	L	L	L	L
Herz Gesamtgewicht	161,6	138,2	174,3	139,8	154,5	125,8	151,6	121,1
Gewicht Atrien	19,8	12,9	32,4	13,1	20,9	11,3	20,2	17,0
Gewicht Ventrikel	134,9	123,7	139,7	124,3	121,8	106,5	125,3	96,3
Gewicht Ventrikel rechts	30,9	16,2	20,7	14,2	14,1	9,3	16,0	16,0
Gewicht Ventrikel links + Septum	109,4	92,4	103,7	99,1	95,2	89,0	98,0	78,9

Tab.9: Aufgelistet sind die gemessenen Gewichte der verschiedenen Herzteile der einzelnen Mäuse, Angaben in mg.

Die Tendenz zur Reduktion in der Gruppe der Läufer zeigte sich ebenfalls leicht bei der Bestimmung der größten Länge und deutlicher noch bei der größten Breite des Herzens (Abb.28). Auch hier waren die Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).



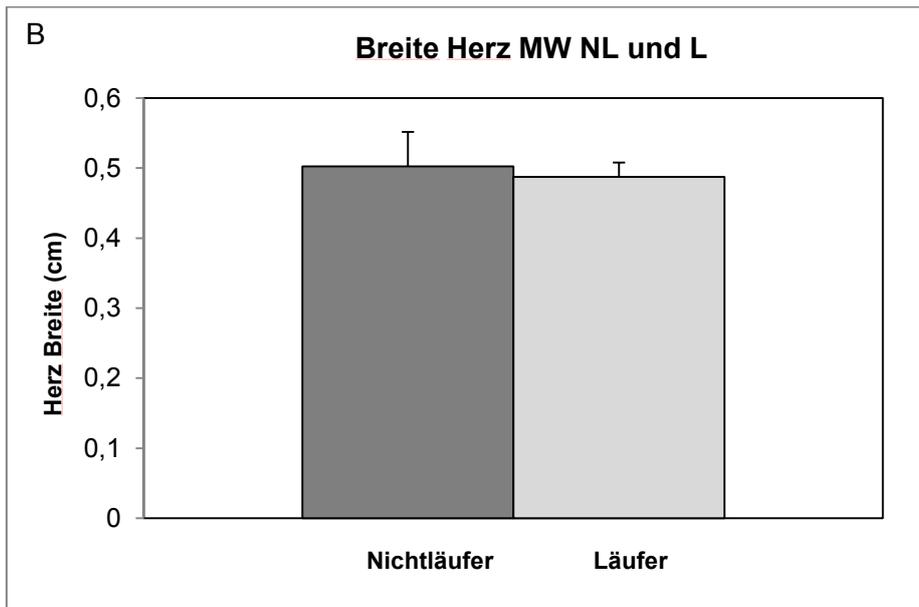
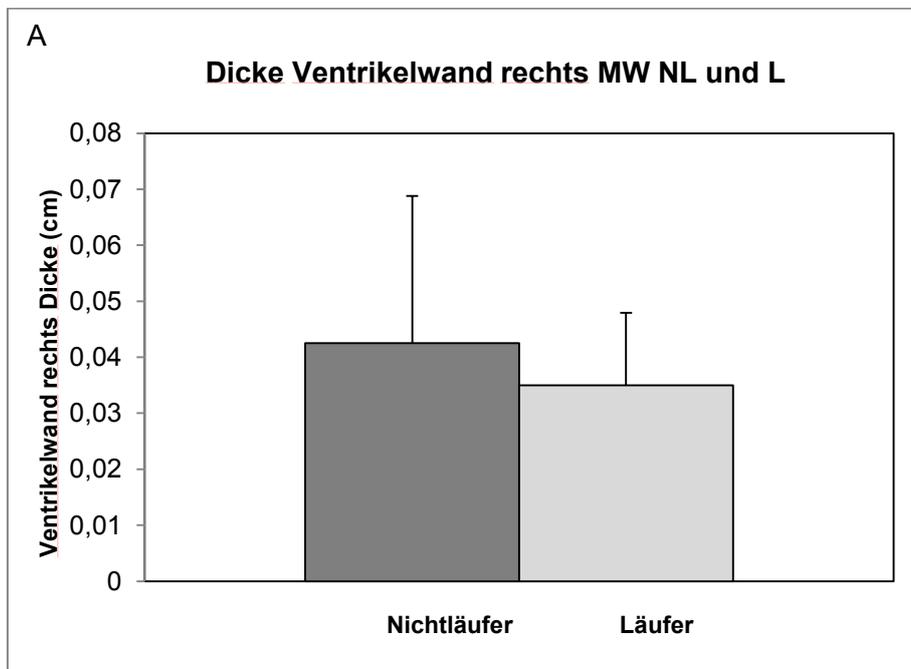


Abb.28: Dargestellt sind die größte Länge (A) und die größte Breite (B) des Herzens (Mittelwert, MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Bei der Bestimmung der Herzwanddicke zeigte sich eine Tendenz zur Reduktion der Wanddicke in der Gruppe der Läufer sowohl für die rechte als auch für die linke Ventrikelwand (Abb.29A,B). Für die Dicke des Septums zeigt sich in der Gruppe der Läufer jedoch ein höherer Wert als in der Gruppe der Nichtläufer (Abb.29C).



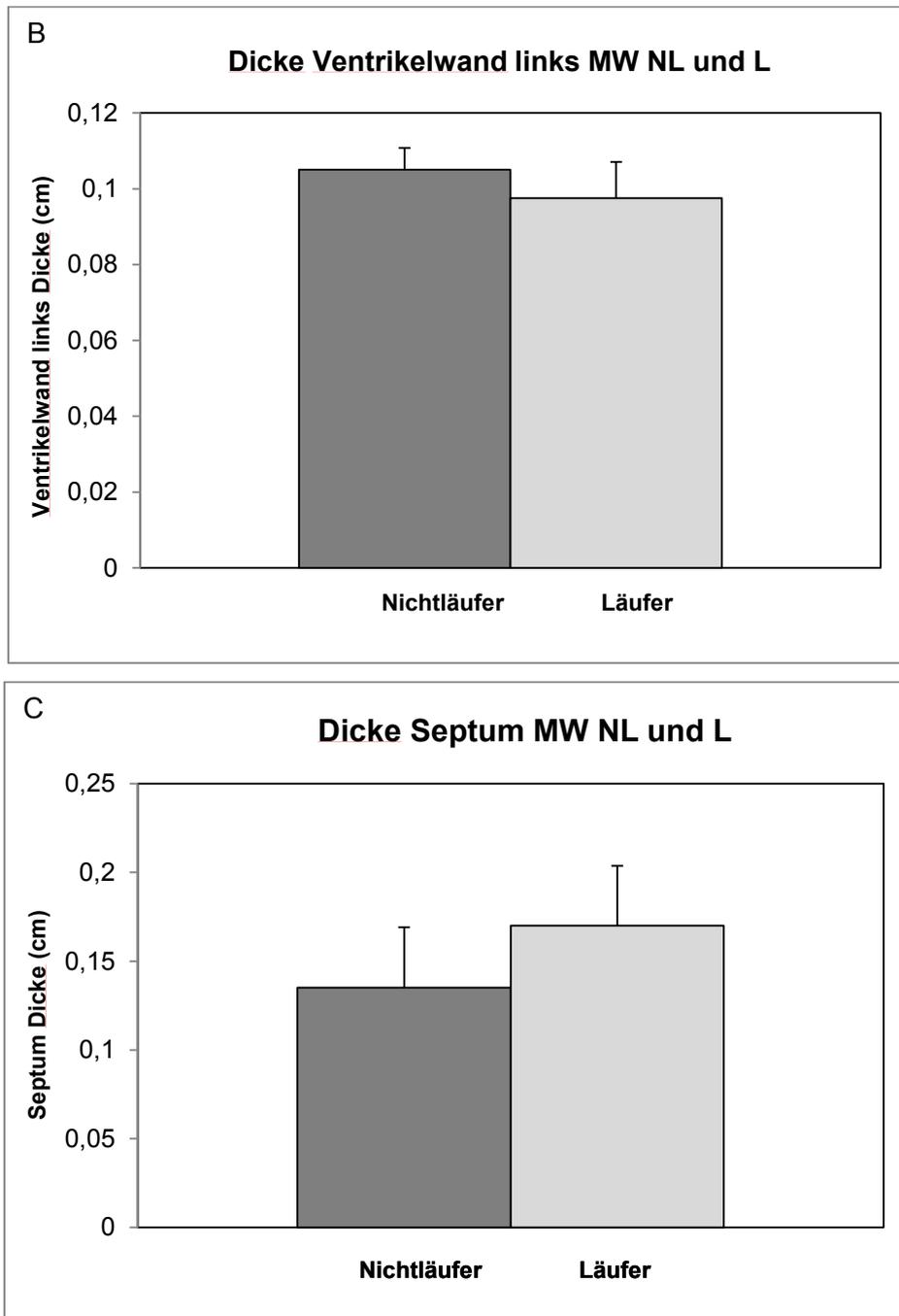


Abb.29: Dargestellt sind die Dicke der rechten Ventrikelwand (A), die Dicke der linken Ventrikelwand (B) und die Dicke des Septums (C) (Mittelwerte, MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Um Anpassungsreaktionen an das Training darzustellen, setzt man häufig das Herzgewicht in Relation zur Tibiallänge (GL). Mit Hilfe dieses Verhältnisses lässt sich aufzeigen, ob es zu einem physiologischen Herzwachstum als kardiometabolische Anpassung an das Training kommt (Gibb et al, 2016). Dabei zeigte sich für die in dieser Arbeit untersuchten Tiere eine leichte

Reduktion im Verhältnis Herzgewicht zu Tibiallänge in der Gruppe der Läufer (Abb.30), die jedoch statistisch nicht signifikant war ($p > 0,05$).

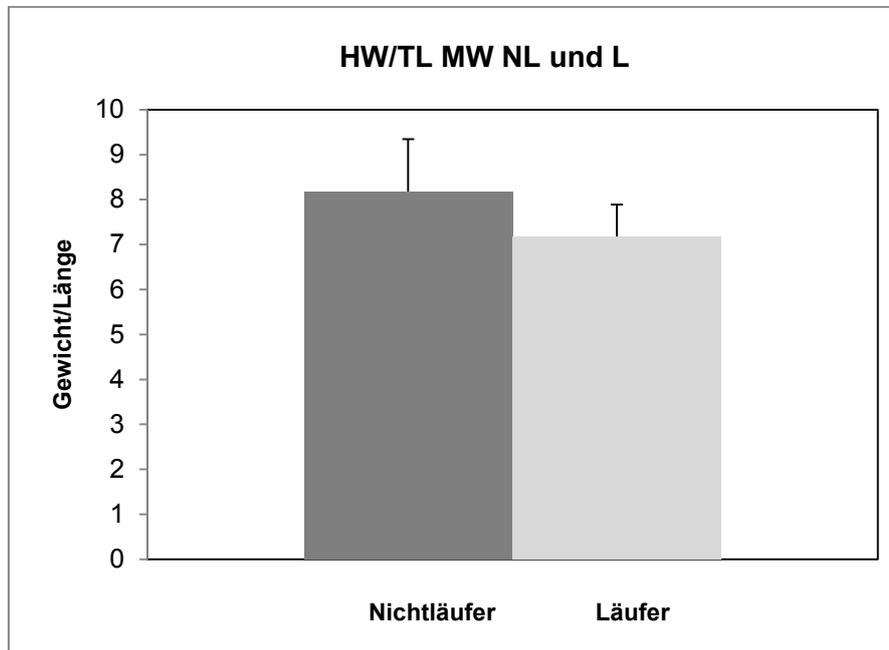


Abb.30: Dargestellt sind die Verhältnisse Herzgewicht (HW) zu Tibiallänge (TL) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) als Mittelwerte (MW).

4.1.8. Bestimmung des Gewichts einzelner Muskeln

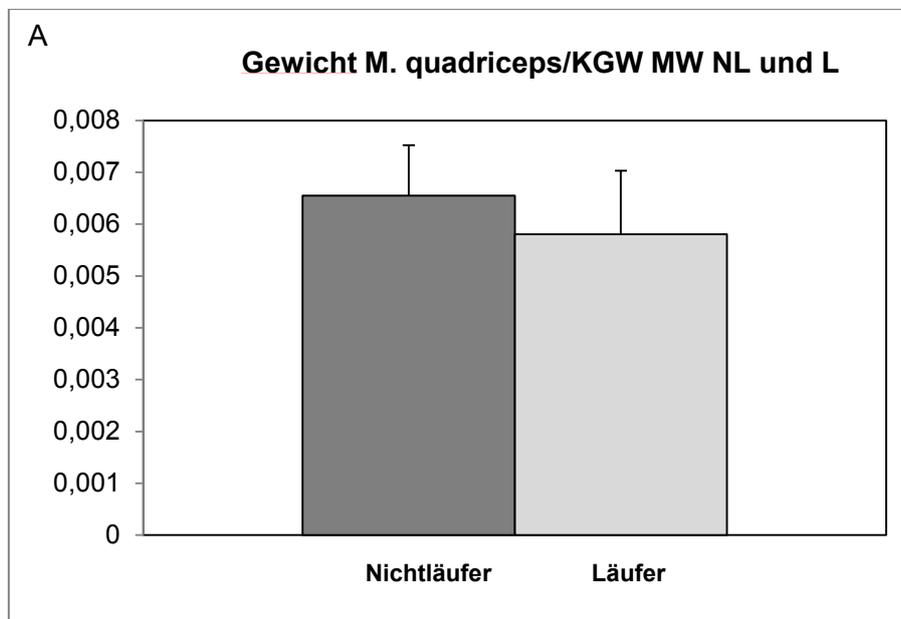
Um zu untersuchen, ob das durchgeführte Laufbandtraining einen Effekt auf die Muskelmasse hat, wurden die präparierten Muskeln gewogen. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die einzelnen Gewichte in Relation zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres:

Maus Nr.	109	110	115	116	111	112	113	114
Gruppe	NL	NL	NL	NL	L	L	L	L
M. gastro-cnemius/ KGW	0,0052	0,0054	0,0059	0,0053	0,0055	0,0054	0,0047	0,0057
M. soleus/ KGW	-0,00061	-0,001	-0,00031	-0,00033	0,00037	-0,00117	0,00028	0,00031
M. tibialis/ KGW	0,0012	0,0013	0,0012	0,0016	0,0014	0,0015	0,0011	0,0015
M. edl/KGW	0,00030	0	0,00031	0,00033	0,00037	0,00039	0,00028	0,00031
M. quadrices/ KGW	0,0076	0,0068	0,0053	0,0063	0,00744	0,0058	0,0045	0,0054
Mm. adductores/ KGW	0,0033	0,003	0,0015	0,0013	0,0018	0,0031	0,0031	0,0012

M. pectorales/ KGW	0,0178 (beide)	0,0023	0,0028	0,002	0,0029	0,0023	0,0019	0,0025
Zwerchfell/ KGW	0,0036	0,0027	0,0025	0,0026	0,0033	0,0019	0,0019	0,0031

Tab.10: Aufgelistet sind die Gewichte der präparierten Muskeln relativ zum Körpergewicht. Negative Werte können auf Grund des sehr geringen Muskelgewichtes und damit verbundenen Messungenauigkeiten entstehen.

Statistisch zeigte sich für alle untersuchten Muskeln kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Läufer und der Gruppe der Nichtläufer ($p > 0,05$). Für die großen Extremitätenmuskeln (*M. quadriceps*, *M. gastrocnemius*) und das Zwerchfell ließ sich jedoch eine Tendenz zur Reduktion des relativen Muskelgewichtes in der Gruppe der Läufer feststellen (Abb.31):



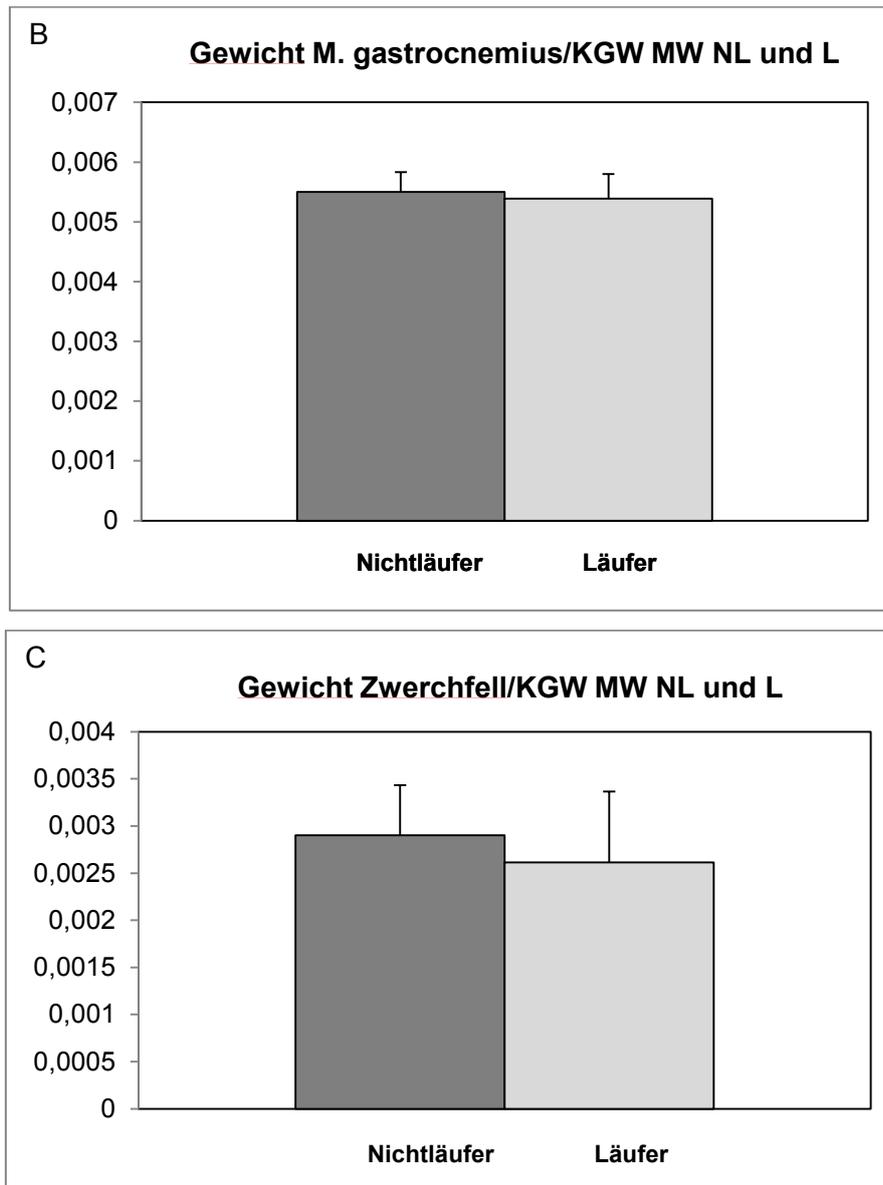


Abb.31: Dargestellt ist der Mittelwert des Gewichts des *M.quadriceps* (A), des *M.gastrocnemius* (B) und des Zwerchfells (C) relativ zum Körpergewicht (KGW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

4.1.9. Lebergewicht und leberrelevante Parameter

Um zu untersuchen, ob das durchgeführte Laufbandtraining einen Effekt auf das Organgewicht der Leber hat, wurde die Leber gewogen. Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die einzelnen Gewichte in Relation zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres:

Maus Nr.	109	110	115	116	111	112	113	114
Gruppe	NL	NL	NL	NL	L	L	L	L
Leber/KGW (g)	0,057	0,060	0,046	0,058	0,056	0,056	0,056	0,050

Tab.11: Aufgelistet sind die Gewichte der Leber relativ zum Körpergewicht (KGW) der untersuchten Mäuse.

Statistisch zeigte sich für das Lebergewicht kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Läufer und der Gruppe der Nichtläufer ($p > 0,05$). Das durchschnittliche Gewicht der Leber relativ zum Körpergewicht in der Gruppe der Nichtläufer betrug 0,0556 ($\pm 0,0059$) und in der Gruppe der Läufer 0,0551 ($\pm 0,0028$) (Abb.32).

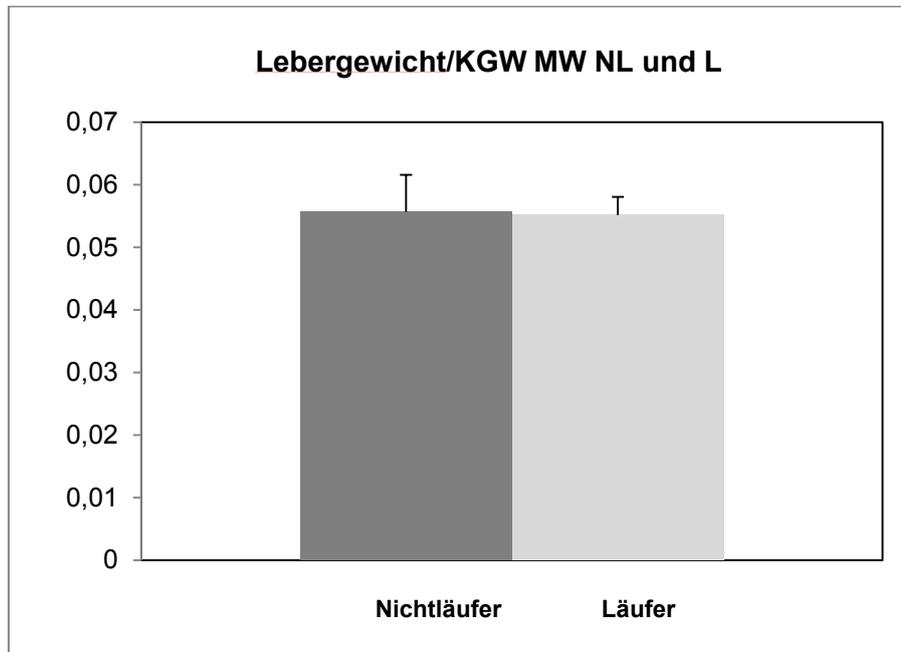


Abb.32: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des Gewichts der Leber relativ zum Körpergewicht (KGW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Bei der blutchemischen Untersuchung fanden sich in Bezug auf leberrelevante Parameter folgende Werte für die einzelnen Mäuse (Tab.12):

Maus Nr.	Referenz	109	110	115	116	111	112	113	114
Gruppe		NL	NL	NL	NL	L	L	L	L
Albumin g/dl	2,5-4,8	2	6,3	2	2,1	1,9	2	3,3	2,3
Alkalische Phosphatase U/L	62-209	62	110	66	62	59	64	42	73
Alanin-Aminotransferase U/L	28-132	120	1278	62	48	52	80	259	41
Cholesteroll mg/dl	36-96	80	0	60	80	77	70	68	105
Triglyceride mg/dl	55-144	219	324	101	161	89	141	169	202
Gesamt- Bilirubin mg/dl	0,1-0,9	0,1	10,6	0,1	0,1	0,1	0,1	2,5	0,1
Totalprotein g/dl	3,6-6,6	4,4	8,5	0	4,4	4,1	4,3	6,3	4,8

Tab.12: Dargestellt sind die mit der Leber assoziierten Blutparameter der untersuchten Mäuse. In Rot sind die von der Referenz nach oben abweichenden Parameter, in Blau die von der Referenz nach unten abweichenden Parameter markiert.

Maus Nummer 110 wurde im Nachfolgenden für die Berechnungen ausgeschlossen, da sie nicht nur Abweichungen bezüglich der leberrelevanten Parameter zeigte, sondern auch in anderen blutchemischen Parametern und in der Hämatologie Veränderungen aufwies und bereits in der Narkose verstarb (vgl. 4.1.11.). Im Folgenden sollen die einzelnen Blutwerte kurz besprochen und auf Unterschiede zwischen „Läufern“ und „Nichtläufern“ eingegangen werden. Diese waren jedoch nur Trends – keine der Differenzen erreichte statistische Signifikanz.

Albumin wird in der Leber synthetisiert und gehört damit zu den leicht bestimmbareren Syntheseleistungsparametern. Der Albuminwert lag in der Gruppe der Nichtläufer bei 2,03g/dl (+/- 0,05g/dl) und in der Gruppe der Läufer bei 2,37g/dl (+/- 0,63g/dl). Die alkalische Phosphatase entstammt u.a. der Leber. In der Gruppe der Nichtläufer betrug der ALP-Wert 63,33U/L (+/- 2,30U/L) und in der Gruppe der Läufer 59,50U/L (+/- 13,02U/L).

Die Alanin-Aminotransferase gehört zu den Transaminasen. Sie ist leberspezifisch und entstammt dem Zytoplasma der Hepatozyten (Übersicht bei Birchard et al., 2006). In der Gruppe der Nichtläufer fand sich ein durchschnittlicher Wert von 76,6U/L (+/- 38,17U/L) und in der Gruppe der Läufer 108U/L (+/- 101,9U/L) (Abb.33).

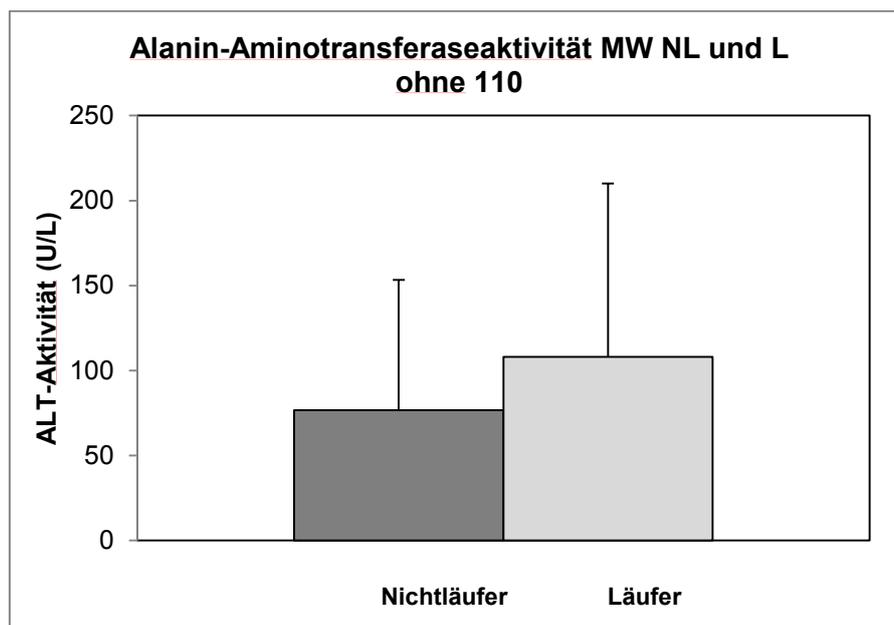


Abb.33: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Alanin-Aminotransferase-Konzentration (ALT) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Cholesterin gehört zu den Lipiden und ist für die Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren lebensnotwendig. Cholesterin wird in der Leber synthetisiert - ein relativ kleiner Teil wird über den Darm aufgenommen (Übersicht bei Birchard et al., 2006). In der Gruppe der

Nichtläufer lag der Wert bei 73,3mg/dl (+/- 11,54mg/dl) und in der Gruppe der Läufer bei 80mg/dl (+/- 17,10mg/dl) (Abb.34).

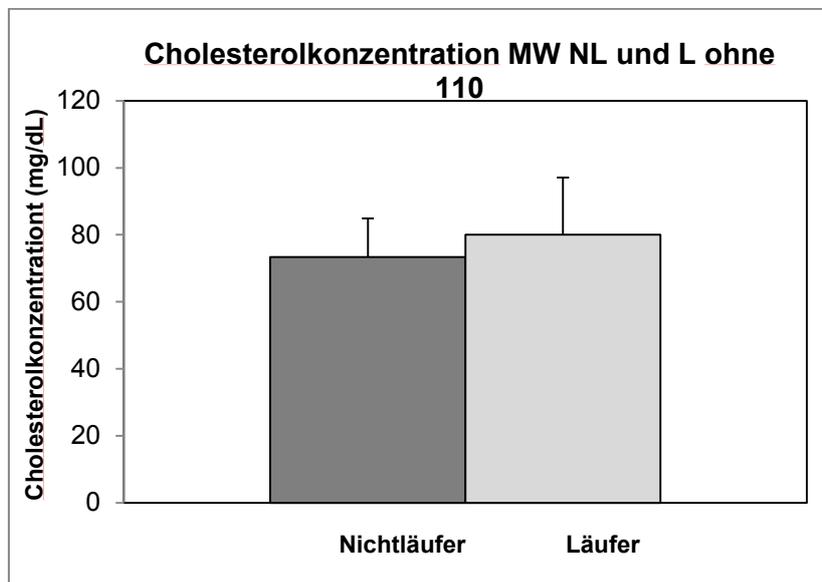


Abb.34: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Cholesterolkonzentration in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Triglyceride dienen dem Fettstoffwechsel und der Energiereserve und spielen u.a. bei der Fettleber klinisch eine Rolle (Übersicht bei Jungermann et al., 2013). In der Gruppe der Nichtläufer lag der Wert bei 160mg/dl (+/- 59,0mg/dl) und in der Gruppe der Läufer bei 157mg/dl (+/- 52,9mg/dl) (Abb.35).

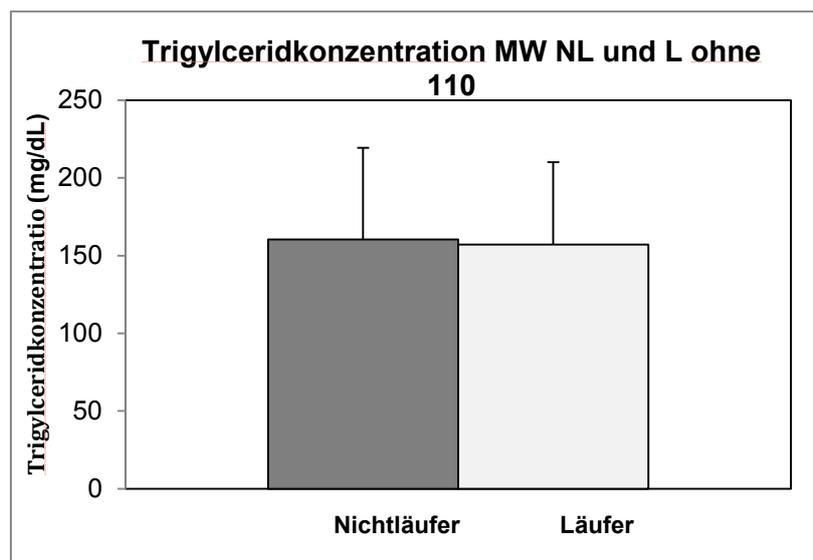


Abb.35: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Triglycerid-Konzentration in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Bilirubin dient u.a. als Marker für die Entgiftungsleistung der Leber (Übersicht bei Rodeck et al., 2008). In der Gruppe der Nichtläufer betrug das Gesamtbilirubin 0,1mg/dl (+/- 0mg/dl) und in der Gruppe der Läufer 0,7mg/dl (+/-1,2 mg/dl).

Das Totalprotein wird ebenfalls zu einem Großteil in der Leber synthetisiert und dient u.a. als Marker für Hepatopathien (Übersicht bei Ecker, 2016). In der Gruppe der Nichtläufer betrug der Wert für das Totalprotein 2,9g/dl (+/- 2,5g/dl) und in der Gruppe der Läufer 4,38g/dl (+/- 0,99g/dl).

4.1.10. Molekularbiologische Analyse der gonadalen Fett pads

Nach Gewichtsbestimmung des rechten und des linken gonadalen Fettdepots wurde für alle acht untersuchten Mäuse mit der aus dem rechten Fettdepot gewonnenen RNA qPCR-Analysen für Leptin, Lipocalin-2, Angiopoietin-2 und GM-C-SF durchgeführt. Diese Marker wurden ausgewählt, weil sie im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel relevant sind und weil die Messwerte des Serum-Zytokin-Arrays (siehe 4.1.11.) darauf hingedeutet hatten, dass sich „Läufer“ und „Nichtläufer“ bezüglich der Expression der entsprechenden Gene unterscheiden könnten.

Für Leptin, ein Adipokin welches sich im Fettgewebe findet und an Inflammationsprozessen beteiligt sowie für das Hunger-und Sättigungsgefühl verantwortlich ist (Übersicht bei Pralong, 2001), zeigte sich nur ein geringer, nicht signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Läufer (0,860 +/- 0,276) und Nichtläufer (1 +/- 0,75) (Abb.36).

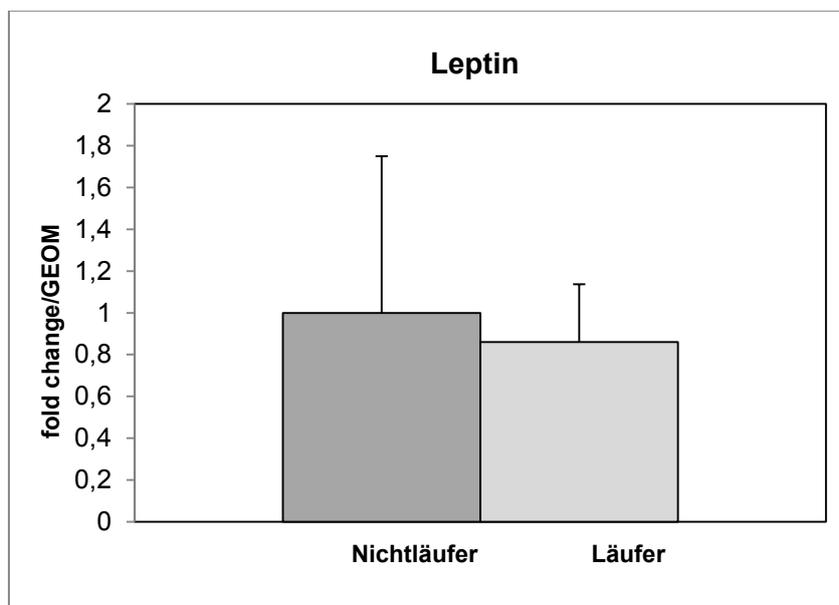
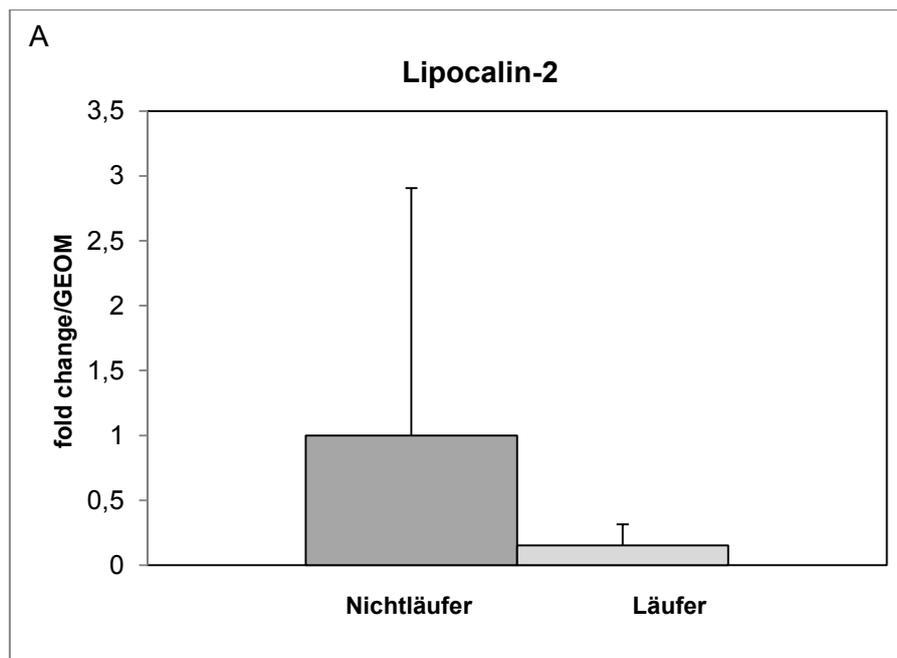


Abb.36: Dargestellt ist die über qPCR ermittelten relativen Konzentrationen an Leptin-mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer.

Lipocalin-2 ist ein Protein, das an die Gelatinase neutrophiler Granulozyten gebunden ist und primär in der Niere gebildet wird. Es dient als Transportprotein, welches Fette binden kann und dadurch die Mobilisierung von Fettreserven reguliert. Wird Lipocalin-2 hochreguliert, kann dies u.a. eine Antwort auf eine akute oder chronische Schädigung der Leber sein, welche mit dem Grad des Entzündungsgeschehens korreliert (Übersicht bei Wieser, 2015). Übergewichtige Mäuse zeigen eine erhöhte Lipocalin-2-mRNA-Konzentration in Leber und Fettgewebe (Wang et al., 2007). In der Gruppe der Läufer zeigte sich für dieses Gen ein geringerer Wert (0,151 +/- 0,163) als in der Gruppe der Nichtläufer (1 +/- 1,906), welcher statistisch jedoch nicht signifikant ist (Abb.37A). Bezieht man Maus Nummer 110 nicht in die Berechnung mit ein, so ergibt sich zudem eine deutlich geringere Standardabweichung für die Gruppe der Nichtläufer (+/-0,006) (Abb.37B). Maus Nummer 110 wies neben Veränderungen in den leberspezifischen Parametern (siehe 4.1.9.) zudem auch Veränderungen in den nierenspezifischen Parametern (siehe 4.1.11.) auf, was den Rückschluss zulässt, dass dadurch auch Abweichungen bezüglich der mRNA-Konzentration von Lipocalin-2 vorliegen könnten.



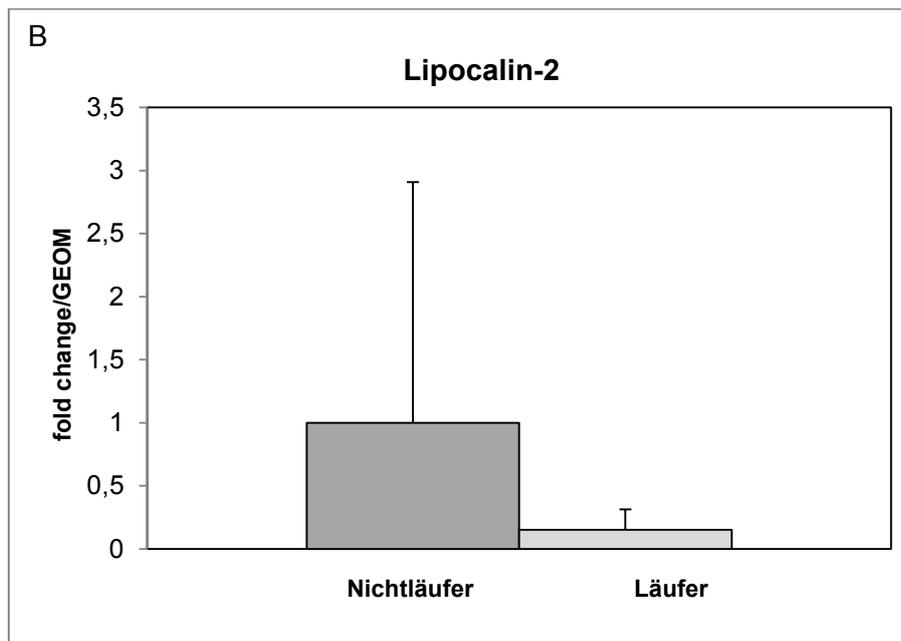


Abb. 37: Dargestellt sind die über qPCR ermittelten relativen Konzentrationen an Lipocalin-2-mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in der Gruppe der Nichtläufer und der Läufer (A), sowie ohne Maus Nummer 110 in der Gruppe der Nichtläufer (B).

Für Angiopoietin-2, welches primär für vaskuläres *Remodelling* verantwortlich ist und von Endothelzellen und adipösem Fettgewebe synthetisiert wird (Übersicht bei Scholz et al., 2015), zeigte sich ebenfalls ein etwas geringerer Wert in der Gruppe der Läufer (0,878 +/- 0,309) im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer (1 +/- 0,668), welcher jedoch nicht signifikant ist (Abb.38). Angiopoietin-2 spielt ebenfalls eine Rolle bei Übergewicht, systemischer Insulinresistenz und Entzündung (Übersicht bei Scholz et al., 2015).

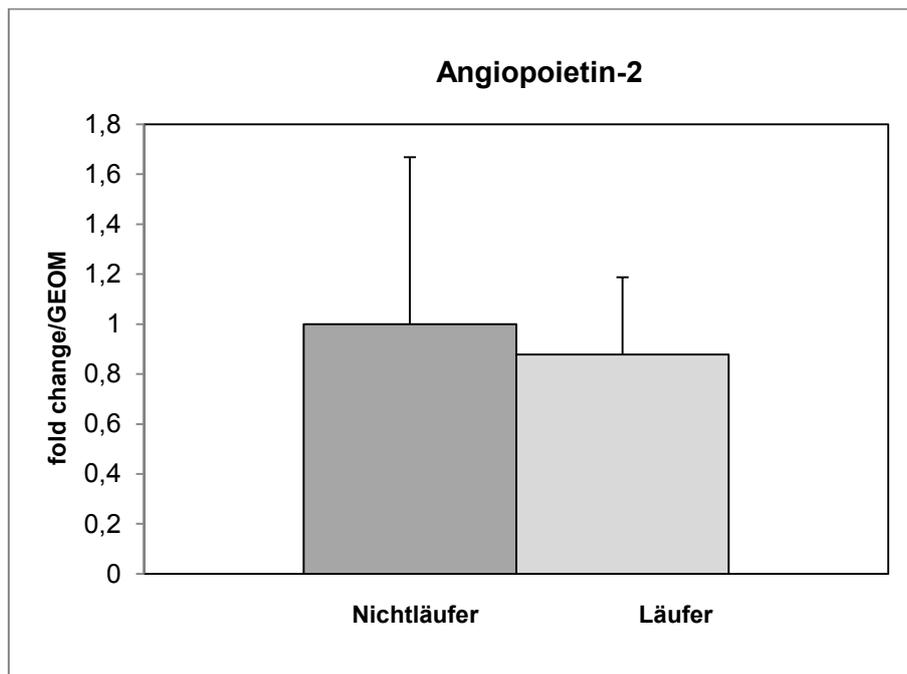


Abb.38: Dargestellt sind die über qPCR ermittelten relativen Konzentrationen an Angiopoietin-2-mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer.

GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) ist ein Glykoprotein, welches u.a. in den Zellen des Immunsystems des Endothels zu finden ist. Zudem spielt es eine zentrale Rolle bei der Reduktion der Futteraufnahme und des Körpergewichtes (Übersicht bei Reed et al., 2005). GM-CSF-*knockout*-Mäuse zeigen eine Neigung zu Übergewicht und Hyperphagie (Kim et al., 2008). Es ließ sich hier ebenfalls ein niedriger Wert in der Gruppe der Läufer (0,26 +/- 0,140) im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer (1 +/- 1,39) finden, welcher jedoch statistisch nicht signifikant ist (Abb.39).

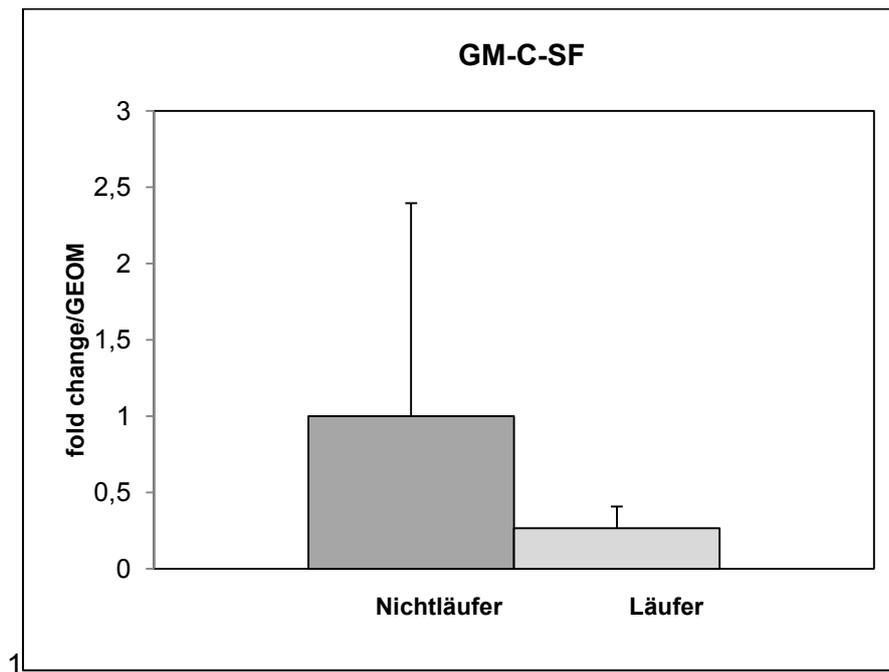


Abb.39: Dargestellt sind die über qPCR ermittelten relativen Konzentrationen an GM-C-SF-mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer.

4.1.11. Blutanalyse und Zytokin-Array

Um zu untersuchen, ob das durchgeführte Laufbandtraining einen Effekt auf Blutparameter hat, wurde das Blut sowohl hämatologisch als auch blutchemisch untersucht. Bei der hämatologischen Untersuchung fanden sich für die einzelnen Mäuse folgende Werte (Tab.13):

Parameter	Referenz	109NL	110NL	115NL	116NL	111L	112L	113L	114L
WBC 10 ³ /mm ³ (weiße Blutzellen)	3,0- 15,0	7,9	1,6	8,1	8	5,2	5,1	3,7	4,2
RBC 10 ⁶ /mm ³ (rote Blutzellen)	5,0- 12,0	10,32	3,02	13,33	10,8	10,62	12,96	9,38	13,33
HGB g/dl (Hämoglobin)	11,1- 18,0	19,2	5,8	19,4	15,8	15,3	18,3	13,8	19,1
HCT % (Hämatokrit)	36,0- 52,0	51,3	14,9	67,5	53,4	52,8	63,7	46,3	66
PLT 10 ³ /mm ³ (Blutplättchen)	140- 600	1254	134	745	1974	1336	336	181	1075
MCV µm ³ (mittleres	44-69	50	49	51	49	50	49	49	49

korpuskuläres Volumen)									
MCH pg (mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt)	12,0-24,5	18,6	19,2	14,6	14,6	14,4	14,1	14,7	14,4
MCHC g/dl (mittlere korpuskulärer Hämoglobinkonzentration)	21,6-42,0	37,4	38,9	28,8	29,6	29	28,6	29,7	29
RDW % (Erythrozyten-Verteilungsbreite)	21,0-25,0	13,3	13,1	13,9	13	13,3	13,3	13,6	13,3
MPV μm^3 (mittleres Thrombozytenvolumen)	4,6-7,3	5,2	6,7	5,4	5,3	5,2	5,5	6,3	5,3
LYM $10^3/\text{mm}^3$ (Lymphozyten)	1,2-3,2	6,8	1,5	6,3	6,6	4,3	4,2	3,1	3,5
MONO $10^3/\text{mm}^3$ (Monozyten)	0,3-0,8	0,3	0	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2
GRAN $10^3/\text{mm}^3$ (Granulozyten)	1,2-6,8	0,8	0,1	1,5	1,1	0,7	0,7	0,5	0,5
Lym%	0,0-99,0	87,4	94,8	78,1	83	82,2	84,4	84,9	85
Mono%	0,0-99,0	4,5	1,7	4,8	4	4	4	3,6	4,8
Gran%	0,0-99,0	8,1	3,5	17,1	13	13,8	11,6	11,5	10,2

Tab.13: Dargestellt sind die hämatologischen Parameter der untersuchten Mäuse. Rot sind die von der Referenz nach oben abweichenden Parameter, blau die von der Referenz nach unten abweichenden Parameter markiert.

Maus Nummer 110 wurde im Folgenden nicht in die Auswertung einbezogen, da sie nicht nur Abweichungen in der Hämatologie, sondern auch in den blutchemischen Parametern aufwies (vgl. 4.1.9.). Auf Grund der verminderten Anzahl der weißen Blutkörperchen und der erhöhten Werte bei den leberspezifischen Parametern liegt der Verdacht auf das Vorliegen einer Infektion mit Manifestation in der Leber nahe.

Der Hämatokrit gibt Aufschluss über den Anteil der Erythrozyten am Volumen des Blutes. Eine Erhöhung des Hämatokrit-Wertes findet sich z.B. bei einem Flüssigkeitsdefizit oder in Anpassung an ein Höhentraining (Übersicht bei Friedmann, 2000). Sowohl in der Gruppe der Nichtläufer als auch in der Gruppe der Läufer lag der Hämatokrit-Wert im Mittel über dem Referenzbereich. In der Gruppe der Nichtläufer betrug der Mittelwert des Hämatokrits 57,4% (+/- 8,8%) und in der Gruppe der Läufer 57,2% (+/- 9,2%) (Abb.40).

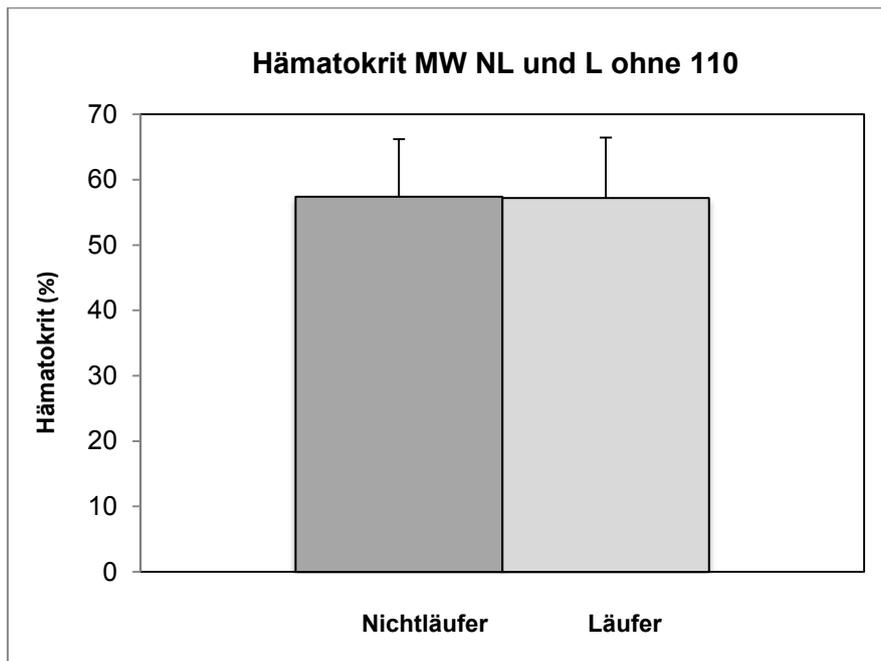


Abb.40; Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des Hämatokrits in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Der WBC stellt die Gesamtheit der weißen Blutkörperchen dar. Dies sind die so genannten Leukozyten, welche ein bedeutender Bestandteil des Immunsystems sind. Die Leukozytenkonzentration befand sich bei allen untersuchten Mäusen (mit Ausnahme von #110) im Normalbereich. Eine Leukopenie (Maus #110), also ein zu niedriger Wert der weißen Blutkörperchen, findet sich bei einem Infekt oder einer Erkrankung des Blutes und / oder des Rückenmarks, aber auch bei Vergiftungen (Übersicht bei Ing, 1984). In der Gruppe der Nichtläufer betrug der Wert der weißen Blutkörperchen $8,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ (+/- $0,1 \times 10^3/\text{mm}^3$) und in der Gruppe der Läufer $4,55 \times 10^3/\text{mm}^3$ (+/- $0,723 \times 10^3/\text{mm}^3$). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Abb.41).

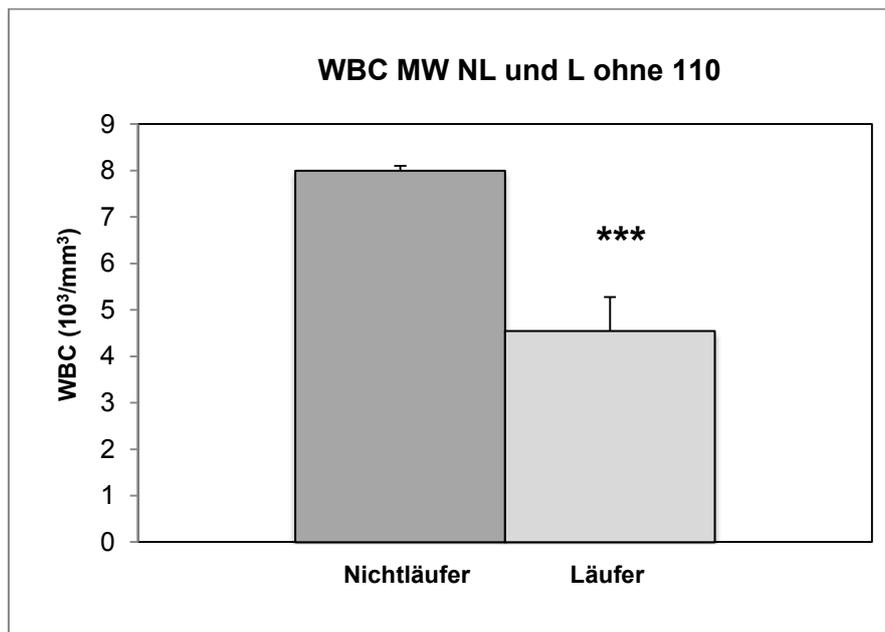


Abb.41: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Konzentration an weißen Blutkörperchen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) (**p<0,001).

Bei der blutchemischen Untersuchung fanden sich für die einzelnen Mäuse folgende Werte (Tab.14):

Parameter	Referenz	109 NL	110NL	115NL	116NL	111L	112L	113L	114L
Amylase U/L	1691- 3615	1965	4423	1642	1734	1551	1625	2130	2022
BUN mg/dL (blood urea nitrogen)	18-29	21	47	18	21	18	21	24	24
Calcium mg/dL	5,9-9,4		51,5	8,3	8,9	8,8	8,8	9,2	9,2
CREA mg/dL (Kreatinin)	0,1-0,8	0	0	0	0	0	0	0	0
GLOB g/dL (Globulin)	-	2,3	2,2		2,3	2,2	2,2	3	2,6
GLU mg/dL	90-192	235	768	137	203	194	216	273	152

(Glucose)									
LAC mmol/L (Laktat)	-	4,63	27,67	3,89	7,73	5,75	6,39	15,49	6,39
Phosphat mg/dL	6,1-10,1		37,9	5,7	6,6	6,7	5,6	11	6,2

Tab.14: Dargestellt sind verschiedene blutchemische Parameter der untersuchten Mäuse. Rot sind die von der Referenz nach oben abweichenden Parameter, blau die von der Referenz nach unten abweichenden Parameter markiert. Die leberspezifischen Parameter sind im entsprechenden Kapitel (Tab.12) zusammengefasst. Auf Grund der mitunter nur sehr geringen Blutmenge die im Zuge der Blutentnahme gewonnen werden konnte, konnten nicht alle Parameter für alle Mäuse bestimmt werden.

Große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren fanden sich insbesondere beim Laktat-Spiegel. Leider lagen hierbei keine Referenzwerte des Labors für die Untersuchung bei der Maus vor. Laktat ist das Anion der Milchsäure und fällt als Endprodukt der anaeroben Glykolyse an. Eine Erhöhung des Laktatspiegels findet sich bei Hypoxie, ausgelöst durch z.B. eine Anämie oder eine Herzinsuffizienz, aber auch bei einer Minderperfusion des Gewebes (Gefäßverschluss). Nach schwerer Muskelarbeit ist die Laktatkonzentration kurzzeitig physiologisch erhöht, was jedoch beim Gesunden rasch reguliert wird (Übersicht bei Jacobs, 1986). Bei den hier untersuchten Mäusen fanden sich in der Gruppe der Läufer im Mittel höhere Werte für die Laktatkonzentration im Blut als in der Gruppe der Nichtläufer (Abb.42).

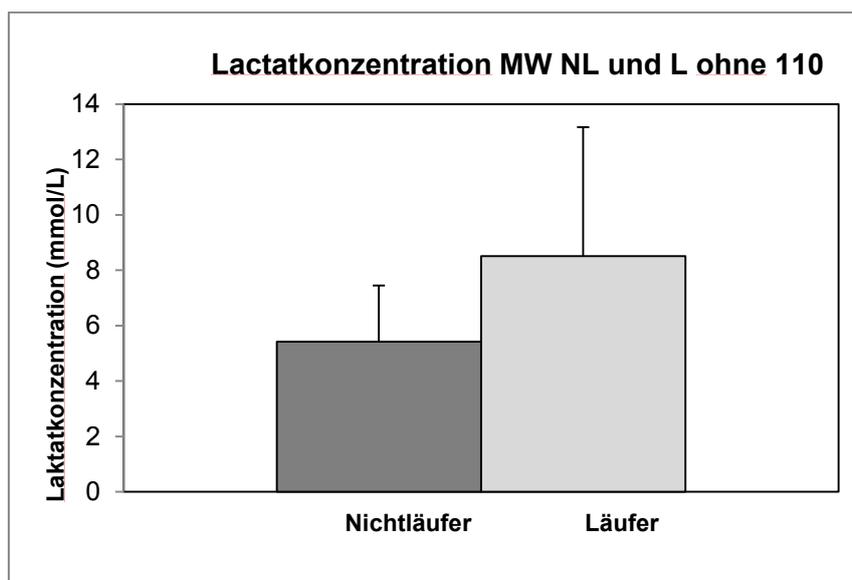


Abb.42: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Blut-Laktatkonzentration in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Leichte Unterschiede fanden sich auch bei anderen Parametern, wie z.B. der Calcium-Konzentration. Bei den hier untersuchten Mäusen zeigen sich höhere Blutcalciumwerte in der Gruppe der Läufer als in der Gruppe der Nichtläufer (Abb.43).

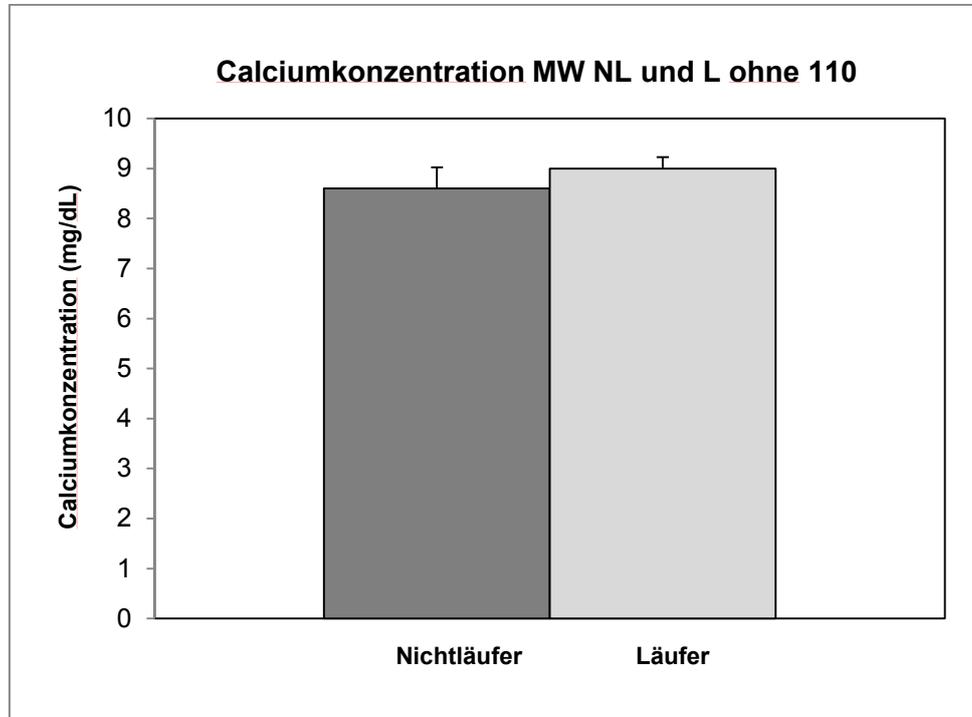


Abb.43: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Blutcalciumkonzentrationen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Glucose ist ein wichtiger Energielieferant des Körpers. Eine wiederholt oder dauerhaft gemessene Hyperglycaemie weist i.d.R. auf einen *Diabetes mellitus* hin. Bei den hier untersuchten Tieren fanden sich tendenziell etwas höhere Blutglucosewerte in der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer (Abb.44).

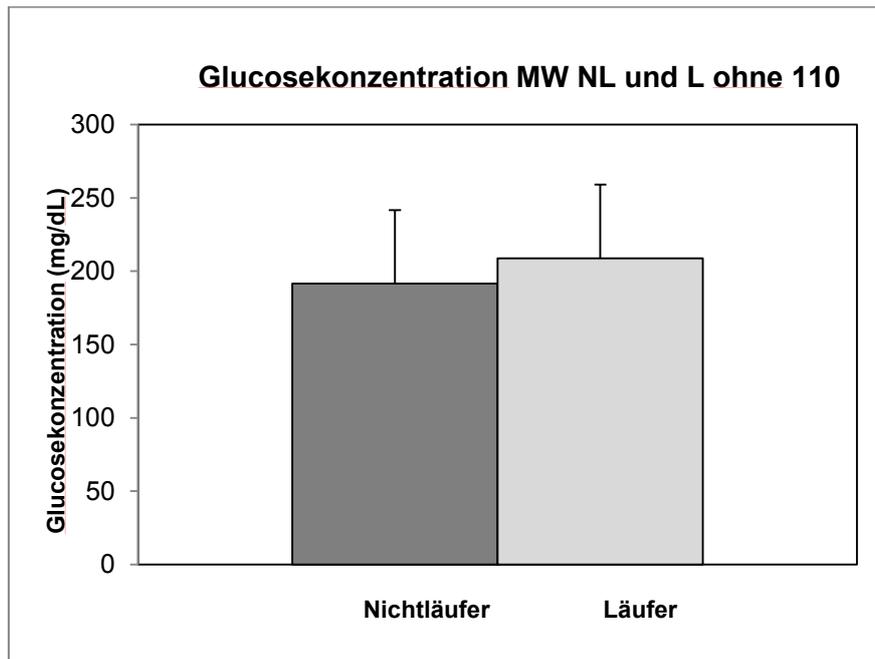


Abb.44: Dargestellt sind die mittlere Glucosekonzentration (MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L).

Die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren wird durch Training beeinflusst. Diese Faktoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen, u.a. auch in der Skelettmuskulatur, und steuern die Adaptation des Muskels an Training (Moldoveanu et al., 2001; Peake et al., 2015). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch das Serum einiger Mäuse mittels eines Zytokin-Arrays analysiert. Allerdings konnten lediglich von vier der acht Mäuse Serumproben gewonnen werden. Da die Blutentnahme retrobulbär erfolgte, konnten maximal 10% des Körpergewichtes an Blutvolumen entnommen werden. Abhängig vom Gewicht der Maus und dem Todeszeitpunkt konnte daher zwar von allen Tieren genug Blut für die Hämatologie und größte Teile der Blutchemie, jedoch nur von vier Tieren (zwei Läufer, 111 / 112, und zwei Nichtläufer, 115 / 116) ausreichend Serum zur Durchführung des Zytokin-Arrays gewonnen werden. Daher kann der Array lediglich eine erste Idee liefern, welche Proteine für eine weitere Untersuchung interessant sein könnten (vgl. Anhang).

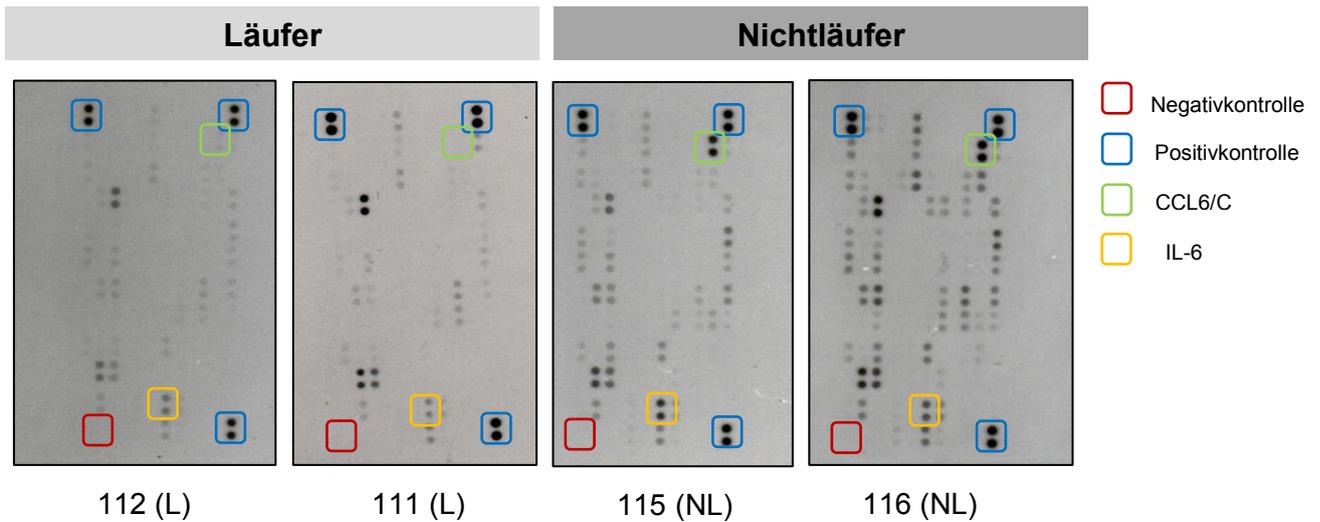


Abb.45: Zu sehen sind die belichteten Röntgenfilme des Zytokin-Arrays der vier untersuchten Mäuse. Negativ- und Positivkontrollen sowie zwei Faktoren, deren Konzentration beim Vergleich zwischen beiden Zweiergruppen deutlich unterschiedlich war, sind farbig markiert (siehe Legende rechts oben).

Die Intensität der erhaltenen Spots wurde mittels ImageJ quantifiziert. Für jedes Tier und jedes Protein wurde der Mittelwert aus beiden *Spots* gebildet (Doppelbestimmung; jeder *Array* enthielt zwei *Spots* pro einzeltem Faktor) und dieser auf die Negativ-Kontrolle normiert (Abb.45).

Für Angiopoietin-2, welches primär für vaskuläres *Remodelling* verantwortlich ist und von Endothelzellen und adipösem Fettgewebe synthetisiert wird (Übersicht bei Scholz et al., 2015), zeigten sich bei den untersuchten Mäusen der Gruppe der Nichtläufer im Vergleich zu den untersuchten Mäusen der Gruppe der Läufer tendenziell höhere Werte (Abb.46).

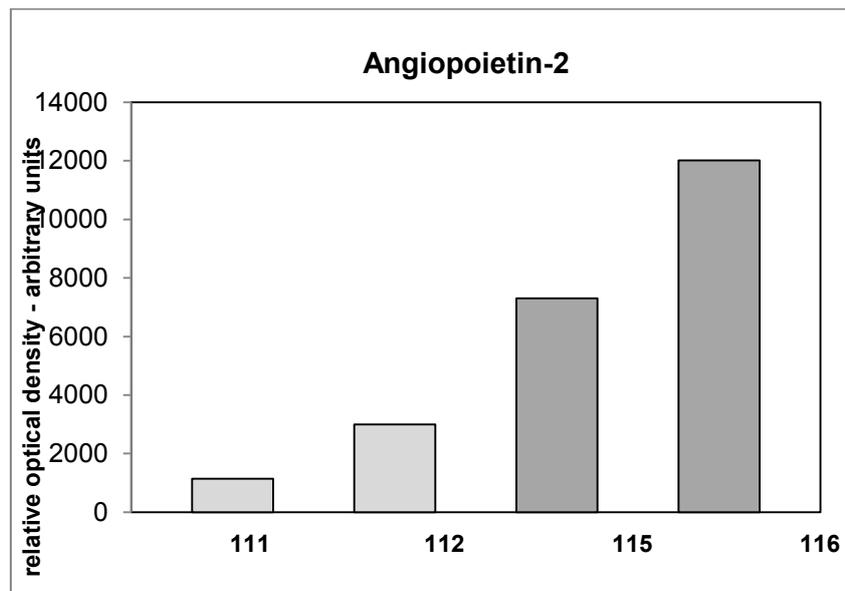


Abb.46: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für Angiopoietin-2 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer).

Für Leptin, ein Adipokin welches sich im Fettgewebe findet und an Inflammationsprozessen beteiligt sowie für das Hunger-und Sättigungsgefühl verantwortlich ist (Übersicht bei Grossman,2000), zeigte sich in der Gruppe der Nichtläufer eine Tendenz zu höheren Werten als in der Gruppe der Läufer (Abb.47). Diese Tendenz fand sich auch bei den Untersuchungen zur Genexpression im Fettgewebe auf mRNA-Ebene (vgl. 4.1.10.).

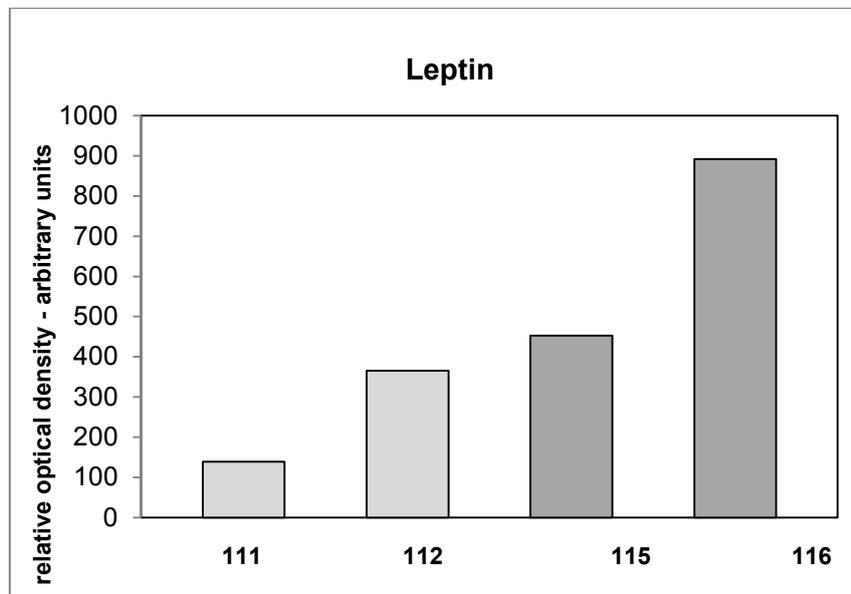


Abb.47: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für Leptin ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer).

Lipocalin-2 bindet an die Gelatinase neutrophiler Granulozyten und wird primär in der Niere gebildet. Es dient als Transportprotein, welches Fette binden kann und dadurch die Mobilisierung von Fettreserven reguliert. Wird Lipocalin-2 hochreguliert, kann dies u.a. eine Antwort auf eine akute oder chronische Schädigung der Leber sein, welche mit dem Grad des Entzündungsgeschehens korreliert (Übersicht bei Wieser, 2015). Bei den hier untersuchten Mäusen fanden sich für die Gruppe der Läufer höhere Werte als für die Gruppe der Nichtläufer (Abb.48).

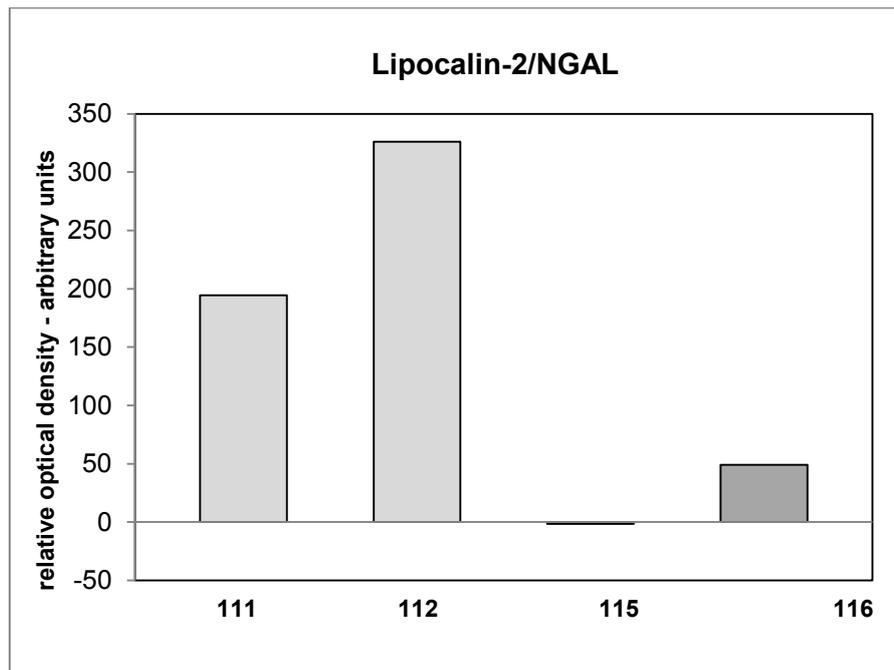


Abb.48: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für Lipocalin-2 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer).

CD14 wird v.a. von Monozyten und Makrophagen gebildet. In endothelialen Zellen hat CD14 eine regulierende Funktion für das Zellüberleben. Das Herauslösen von CD14 aus der Zelloberfläche durch Makrophagen führt zu Apoptose der betroffenen Zellen (Übersicht bei Jack, 2000). Für CD14 zeigte sich hier in der Gruppe der Läufer ein deutlich höherer Wert als in der Gruppe der Nichtläufer (Abb. 49).

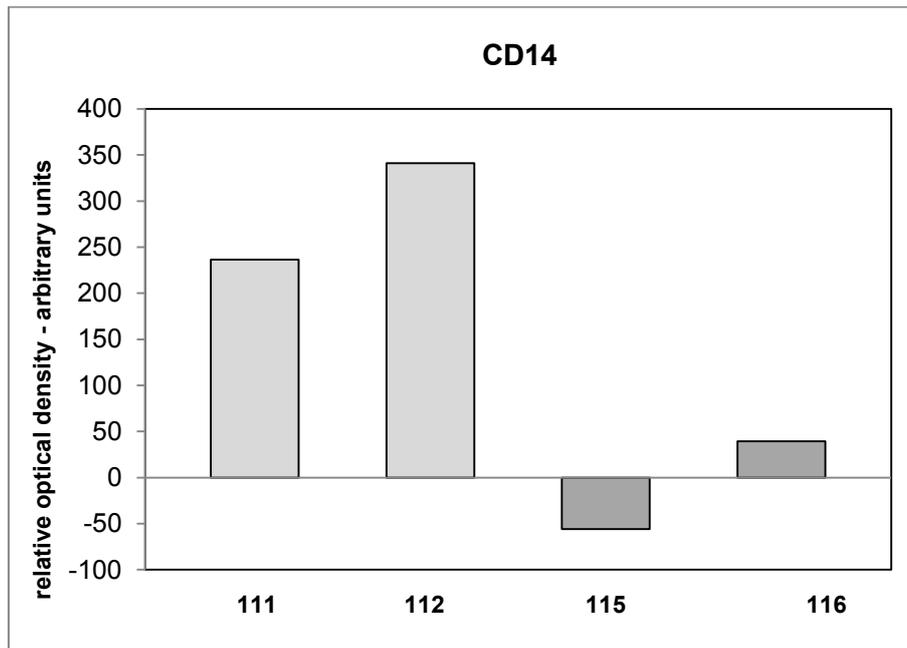


Abb.49: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für CD14 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer).

Negative Werte können auf Grund der Subtraktion des Hintergrundes erhalten werden.

CCL6 ist ein Chemokin und wird im Zuge einer Entzündung durch IFN γ , IL-1 und TNF induziert und von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet (Übersicht bei Ma et al., 2004). Bei den hier untersuchten Mäusen zeigten sich in der Gruppe der Nichtläufer deutlich höhere Werte für CCL6 als in der Gruppe der Läufer (Abb.50).

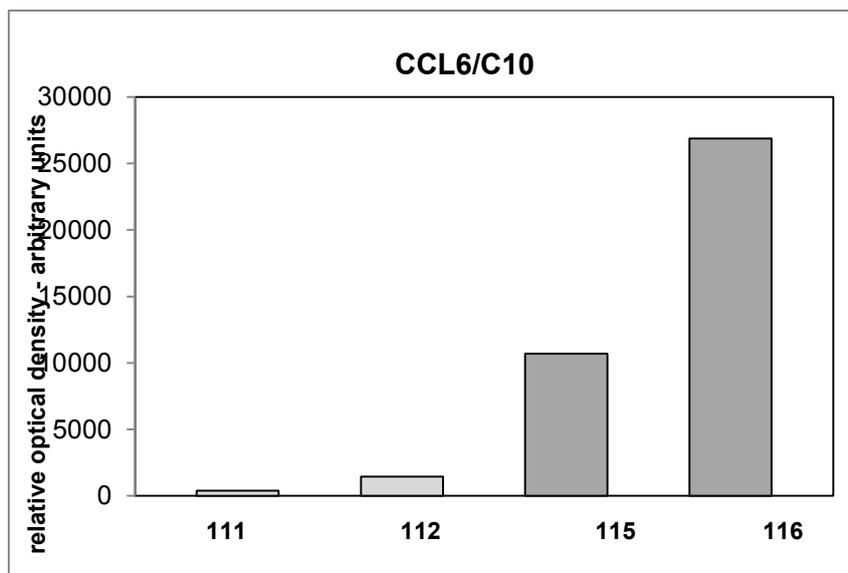


Abb.50: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für CCL6 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer).

GM-C-SF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) wird u.a. von Zellen des Immunsystems und des Endothels sezerniert. Zudem spielt das Protein eine zentrale Rolle bei der Regulation der Futteraufnahme und des Körpergewichtes (Übersicht bei Reed et al., 2005). Hier fanden sich in der Gruppe der Läufer höhere Werte als in der Gruppe der Nichtläufer (Abb. 51).

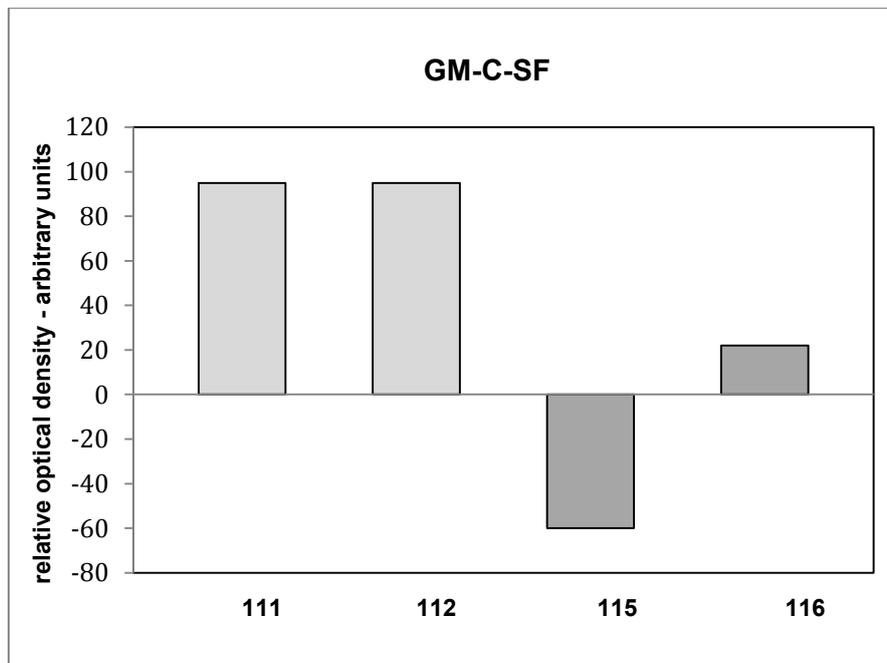


Abb.51: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für GM-C-SF ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer). Negative Werte können auf Grund der Subtraktion des Hintergrundes erhalten werden.

Interleukin 6 reguliert Entzündungsreaktionen des Organismus. Neben seiner zentralen Rolle bei Entzündungen besitzt es zudem eine aktivierende Wirkung auf die Hormonsekretion u.a. von Cortisol, Somatotropin, Glucagon und Adrenalin. Körperliche Aktivität führt zu einer erhöhten IL-6-Konzentration im Serum. Das Maximum findet sich dabei am Ende der Muskelbeanspruchung. Im Anschluss daran fällt die IL-6-Konzentration rasch wieder ab. Das sezernierte IL-6 kommt dabei in Teilen aus den beanspruchten Muskelzellen. Bei trainierten Organismen werden jedoch bei vergleichbarer Belastung sowie in Ruhe im Vergleich zu untrainierten Individuen niedrigere IL-6-Konzentrationen gemessen (Übersichten bei Fischer, 2006; Kim, 2014). Bei den hier untersuchten Mäusen zeigten sich im Einklang dazu in der Gruppe der Nichtläufer höhere IL-6-Konzentrationen im Serum als in der Gruppe der Läufer (Abb.52).

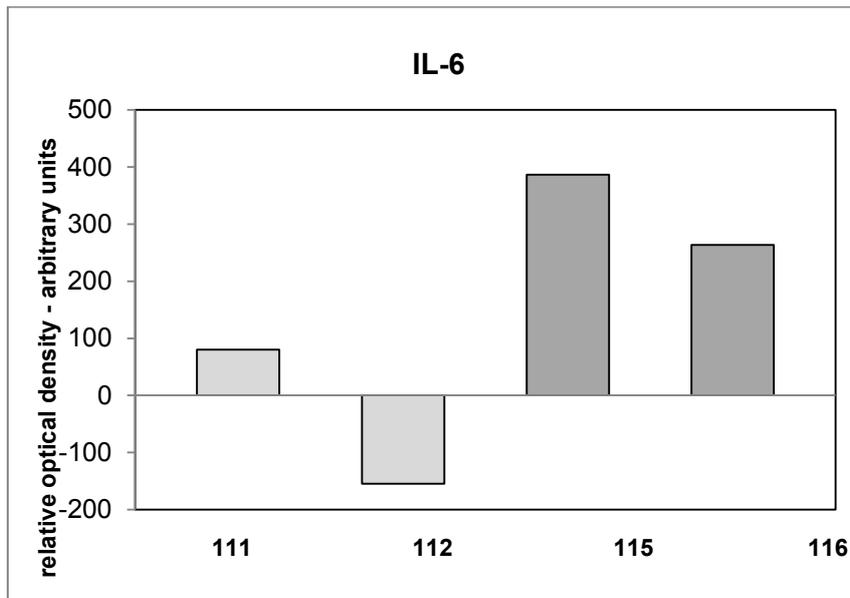


Abb.52: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für IL-6 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer). Negative Werte können auf Grund der Subtraktion des Hintergrundes erhalten werden.

4.2. Analyse von Histonmethylierungsmustern

4.2.1. Untersuchung von Histonmethylierungsmustern in kultivierten Skelettmuskelzellen

Für die Etablierung der Methode der Histonisolierung und zum Test der Antikörper, welche für die Untersuchung der im Rahmen des Trainingsexperiments gewonnenen Muskelproben verwendet werden sollten, wurde ein etabliertes Modellsystem, die murine Myoblasten-Zelllinie C2C12, die *in vitro* zur Differenzierung gebracht werden kann, verwendet. Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig zum Thema Histonmethylierungsmuster in differenzierenden C2C12-Zellen bekannt gewesen.

Die verwendeten C2C12-Zellen wurden nach der Kultivierung in Differenzierungsmedium innerhalb eines Zeitraums von fünf Tagen zu Myotuben differenziert. Der Differenzierungsprozess wurde täglich dokumentiert (Abb.53):

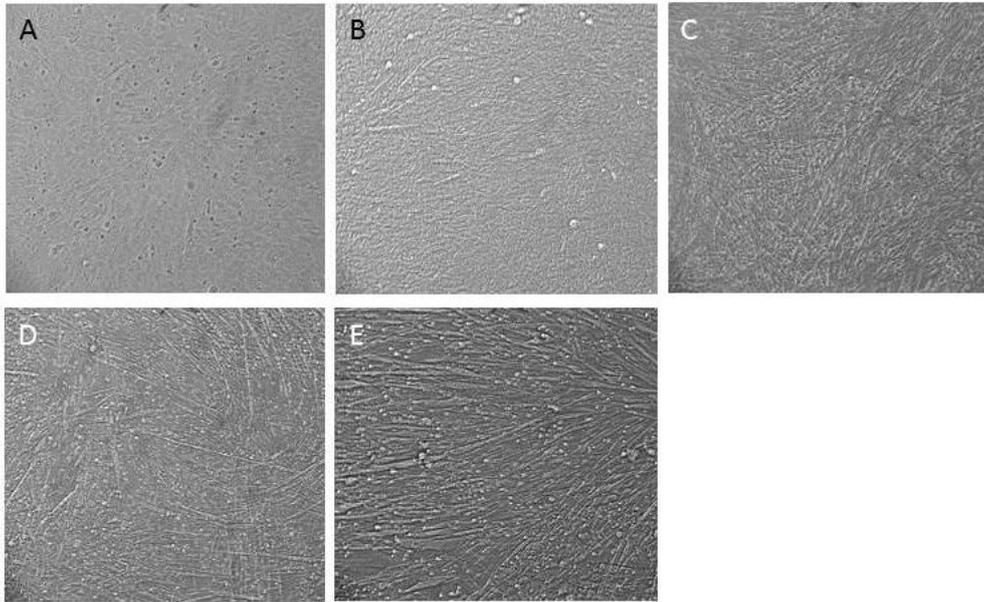


Abb.53: Dargestellt sind C2C12-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses. A: Tag 0, B: Tag 1, C: Tag 3, D: Tag 4, E: Tag 5.

Aus proliferierenden Zellen (Tag 0) sowie 1,3,4 und 5 Tage nach Induktion der Differenzierung wurden die Zellen geerntet, und die Zellsedimente bei -80°C eingefroren. Aus diesen konnten später Histonproteine isoliert werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden dabei insbesondere H3K4-spezifische Methylierungsmuster analysiert, da hierzu in der Arbeitsgruppe bereits Vorarbeiten existierten (Berkholz et al., 2015). Die Ergebnisse (Abb.54) zeigen, dass alle untersuchten Antikörper ein spezifisches Signal hervorbrachten und somit zur Analyse des H3K4-spezifischen Methylierungsmuster in murinen C2C12-Zellen und vermutlich auch Mausgeweben geeignet sind. Zwischen den einzelnen Differenzierungsstadien wurden nur geringe Unterschiede bezüglich des Methylierungsmusters beobachtet.

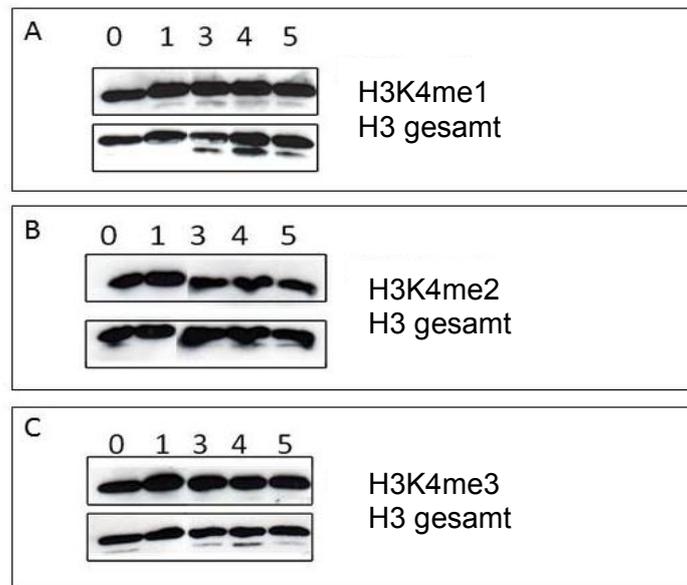


Abb.54: Gezeigt sind H3K4-Methylierungen in differenzierenden C2C12-Zellen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer *Western Blot*. Er zeigt spezifische Signale für H3K4-Monomethylierung (H3K4me1, A), H3K4-Dimethylierung (H3K4me2, B), H3K4-Trimethylierung (H3K4me3, C) und H3 gesamt (A-C). Jeder *Blot* wurde zunächst mit einem H3K4me1/2/3-spezifischen AK (aus Kaninchen) und dann nach Abklingen des Signals und Waschen mit einem gegen H3 gesamt gerichteten AK (aus Maus) inkubiert. Für jede Methylierungsform bzw. -stufe wurde ein eigener *Blot* angefertigt.

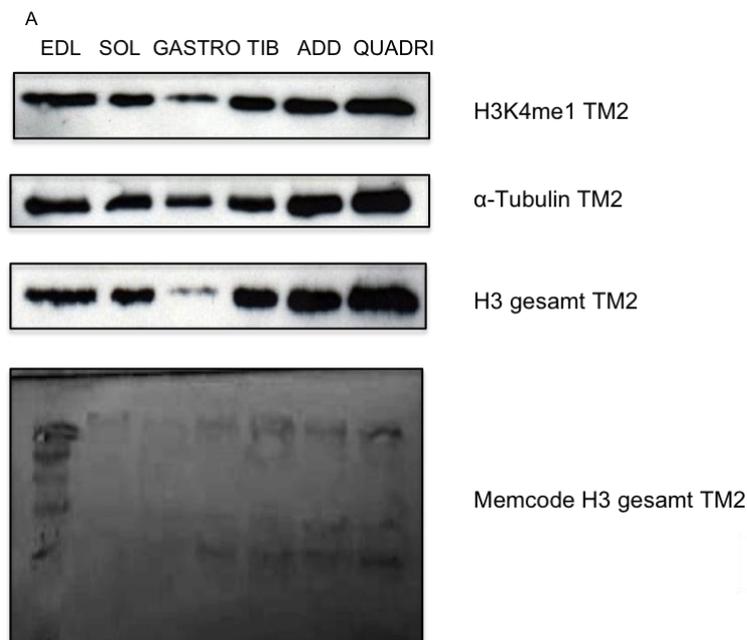
4.2.2. Histonmethylierungsmuster in der murinen Skelettmuskulatur im untrainierten und im trainierten Zustand

Um zu untersuchen, welche Auswirkung das durchgeführte Laufbandtraining auf das H3K4-Methylierungsmuster der Muskulatur der murinen Hinterextremität besitzt, wurden von allen acht Mäusen des Trainingsexperimentes die Histone aus dem rechten *M. gastrocnemius* isoliert und mittels *Western Blot* untersucht. Um die Methode zu etablieren und zusätzlich Basisdaten zu Histonmethylierungsmustern in verschiedenen Muskeln der murinen Hinterextremität zu erhalten, wurden zudem in einem Vorexperiment ausgewählte Muskeln der rechten Hinterextremität von fünf weiteren Mäusen („Testmäuse“), welche nicht in die Trainingsstudie eingeschlossen waren, auf ihr Methylierungsmuster hin untersucht.

Neben der Untersuchung der H3K4-Mono- und Dimethylierung wurden in den untersuchten Geweben als Ladekontrollen zudem Gesamt-H3 und α -Tubulin bestimmt, um den Gehalt an H3K4me1 und H3K4me2 zu quantifizieren. Zusätzlich wurde für jeden *Blot* noch eine MemCode-Färbung angefertigt.

Vorgesehen war zudem die Untersuchung der H3K4-Trimethylierung in den untersuchten Geweben in Analogie zum Vorversuch an C2C12-Zellen (4.1.12.1.). Wenngleich jedoch neben

dem ursprünglich für C2C12-Zellen verwendeten Antikörper zwei weitere H3K4me3-spezifische Antikörper getestet wurden, konnten bei murinem Skelettmuskelgewebe keine spezifischen Signale für diese Modifikation erhalten werden. Interessanterweise konnte aber für humane Rhabdomyosarkomzellen (RMZ-RC2), welche transformierte Myoblasten darstellen, mit allen Antikörpern eine H3K4-Trimethylierung nachgewiesen werden (nicht gezeigt), sodass davon auszugehen ist, dass die Antikörper funktionell und grundsätzlich auch für Muskelzellen einsetzbar sind, dass sie aber nur für Analysen an humanem Gewebematerial geeignet sind. Als weitere Positivkontrolle wurde ein Histonprotein-Extrakt aus ebenfalls humanen HeLa-Zellen analysiert, wo gleichfalls die H3K4-Trimethylierung nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Das H3K4-spezifische Monomethylierungsmuster wurde zunächst an Histonpräparationen aus verschiedenen Muskeltypen der fünf Testmäuse analysiert. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Abb.55 dargestellt. Trotz großer Standardabweichungen ist erkennbar, dass sich die einzelnen Muskeltypen bezüglich des Grades an H3K4-Monomethylierung unterscheiden, wenngleich keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Allerdings ist bei der Auswertung der Daten zu beachten, dass die Ergebnisse auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Normierungsmethode deutlich variieren.



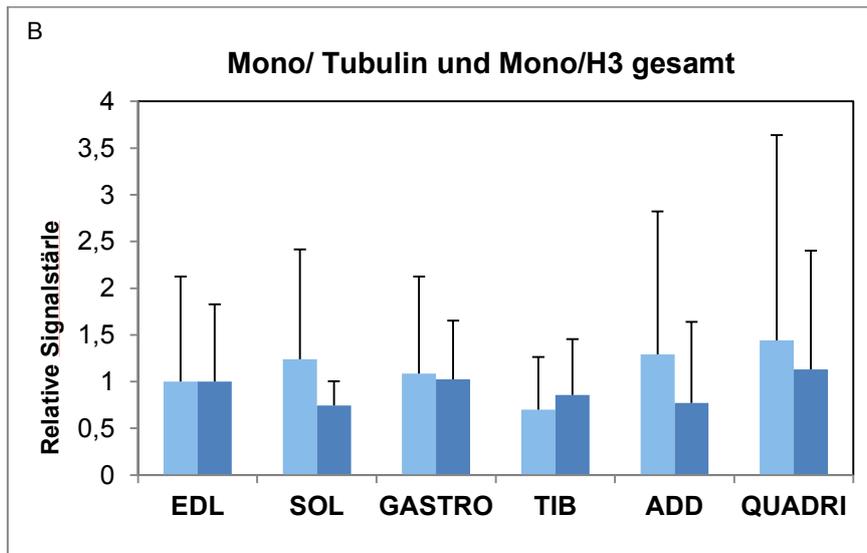
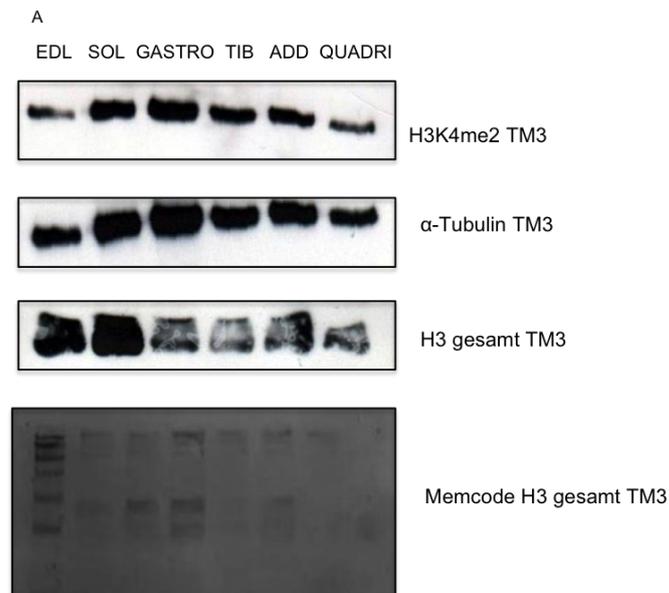


Abb.55.: Dargestellt ist das H3K4-spezifische Monomethylierungsmuster in verschiedenen Muskeltypen der fünf Testmäuse. A) zeigt repräsentativ die angefertigten *Western Blots* von TM2. Diese zeigen spezifische Signale für die H3K4-Monomethylierung (H3K4me1), α -Tubulin und H3 gesamt. Zusätzlich ist ein Ausschnitt der Memcode-Färbung gezeigt. B) Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf H3-gesamt.

Die Untersuchung der H3K4-spezifischen Dimethylierung an den Testmäusen ergab das in Abb.56 dargestellte Bild:



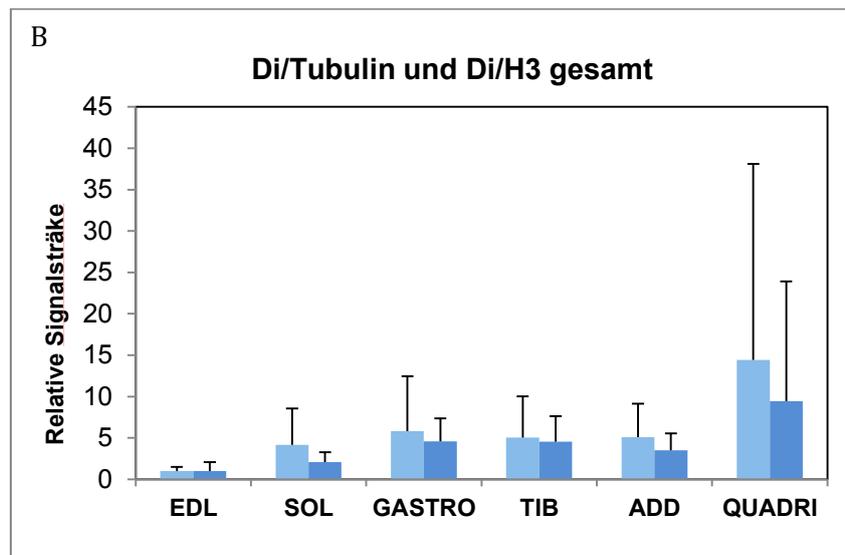
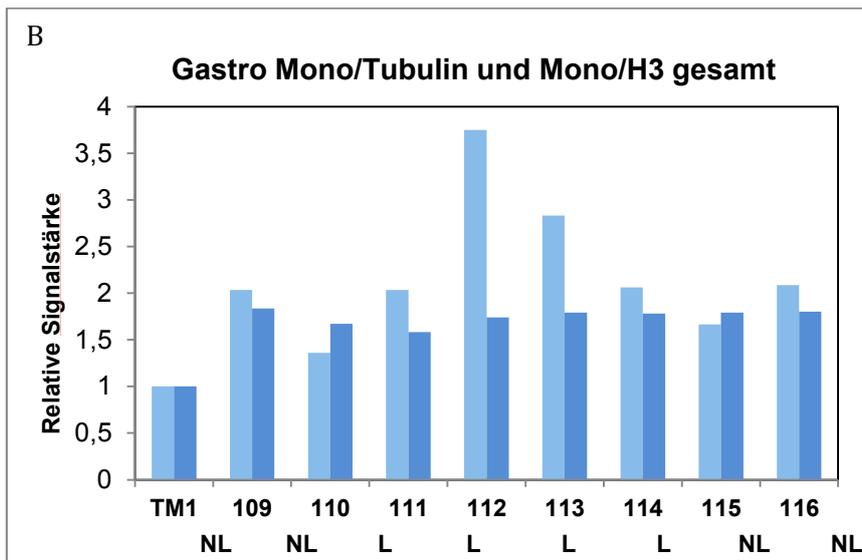
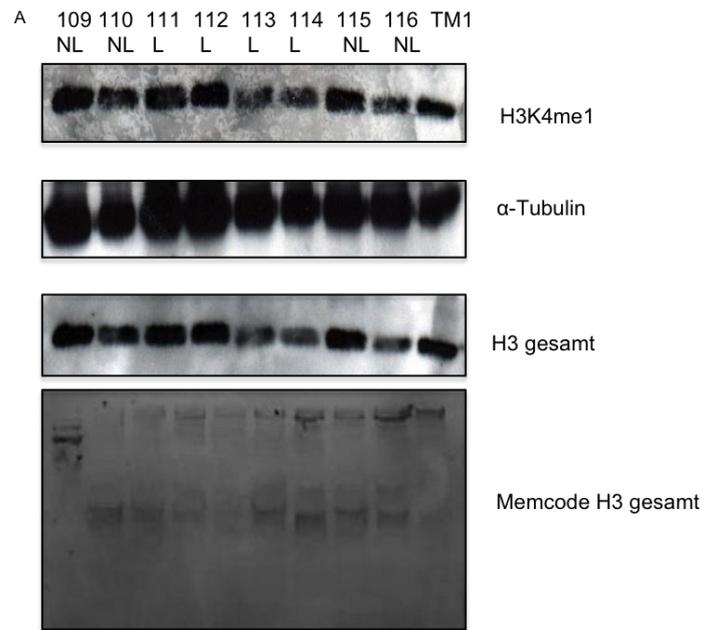


Abb.56: Dargestellt ist das H3K4-spezifische Dimethylierungsmuster in verschiedenen Muskeltypen der fünf Testmäuse. A) zeigt repräsentative *Western Blots* von TM3. Diese zeigen spezifische Signale für die H3K4-Dimethylierung (H3K4me₂), α -Tubulin und H3 gesamt. Zusätzlich ist ein Ausschnitt der Memcode-Färbung gezeigt. B) Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf H3-gesamt.

Anschließend wurden die H3K4-spezifischen Mono- und Dimethylierungsmuster im *M. gastrocnemius* der acht Mäuse des Trainingsexperimentes untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.57 dargestellt. Die Auswertung/Quantifizierung der *Western Blots* zeigt, dass in der Gruppe der Läufer eine geringgradig stärkere H3K4-Monomethylierung vorlag als in der Gruppe der Nichtläufer, zumindest dann, wenn auf die Intensität des α -Tubulin-Signals normalisiert wurde. Dieses Ergebnis war jedoch statistisch nicht signifikant.



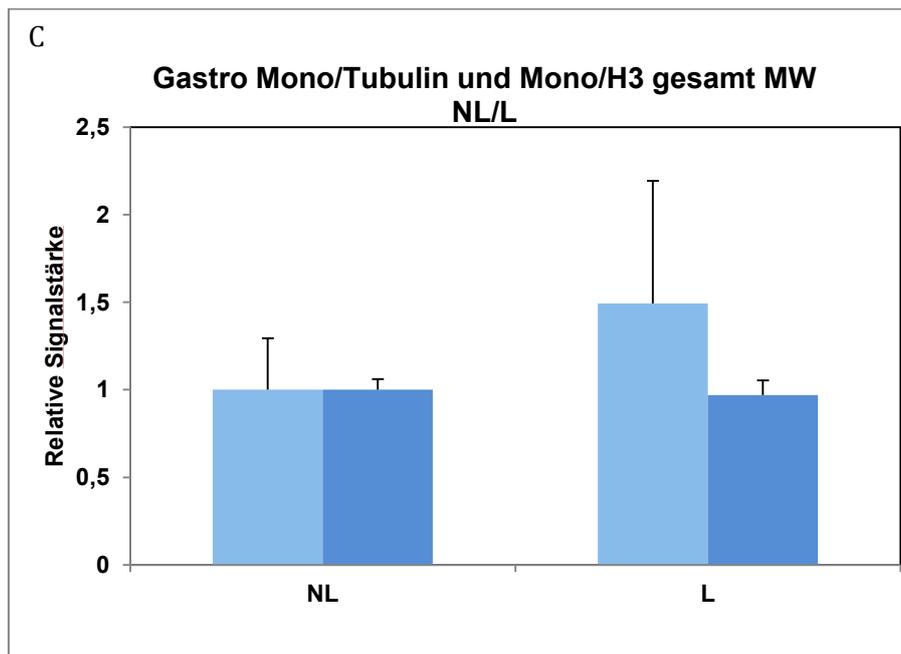
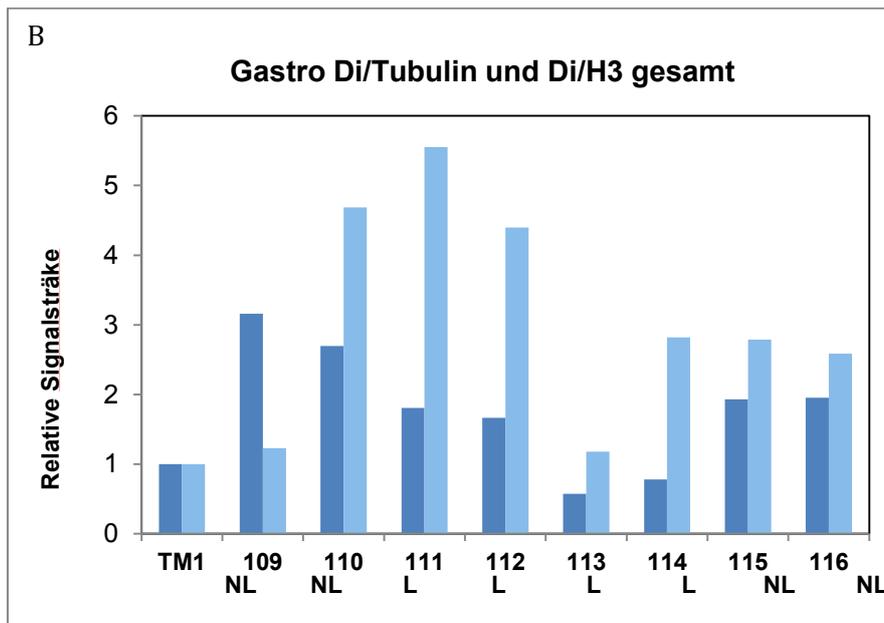
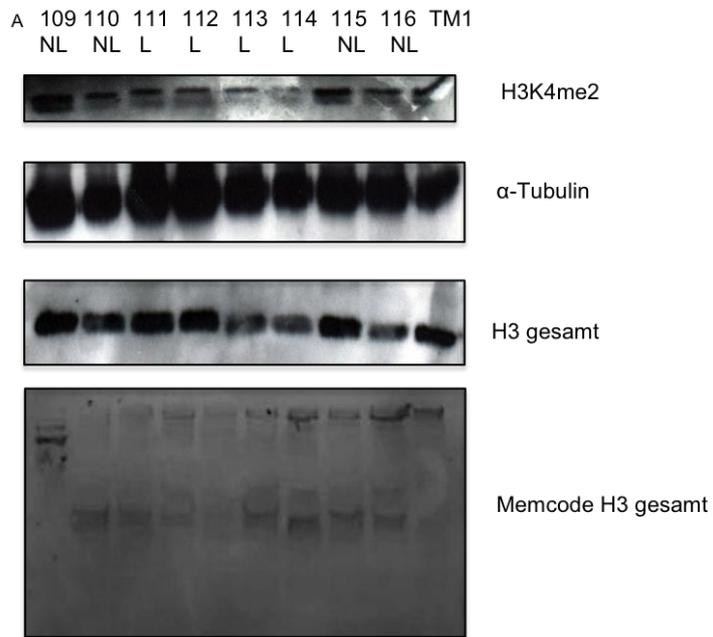


Abb.57: Dargestellt ist die Analyse der H3K4-spezifischen Monomethylierungsmuster im *M. gastrocnemius* der Mäuse der Trainingsstudie. A) Originalblots für H3K4me1, H3 gesamt sowie α -Tubulin und Memcode-Färbung. B) Quantifizierung des H3K4-spezifischen Monomethylierungsmusters. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf H3 gesamt. C) zeigt das H3K4-spezifische Monomethylierungsmuster des *M. gastrocnemius* in der Gruppe der Nichtläufer (normiert auf 1) und der Gruppe der Läufer. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf H3 gesamt.

Bei der Untersuchung der H3K4-spezifischen Dimethylierung im *M. gastrocnemius* ergab sich das in Abb.58 dargestellte Bild:



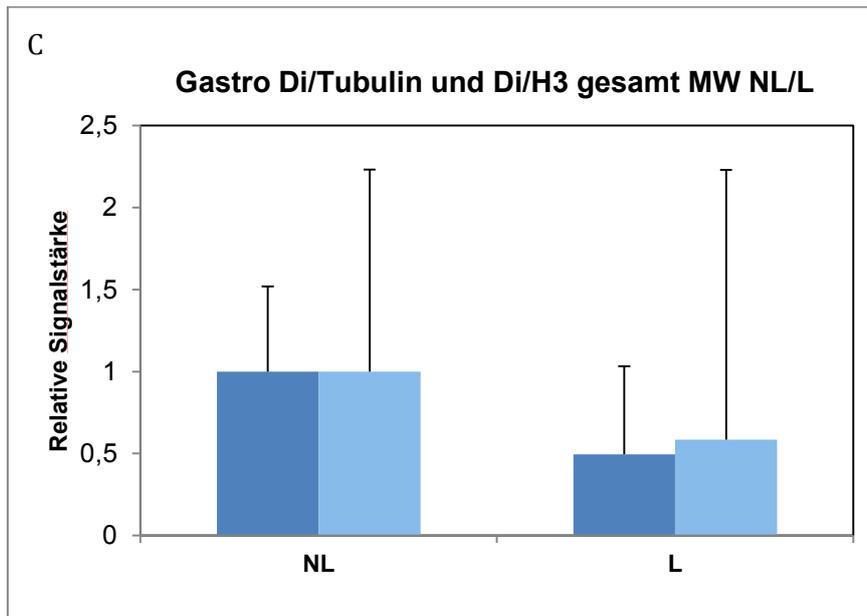


Abb.58: Dargestellt ist die Analyse der H3K4-spezifischen Dimethylierungsmuster im *M. gastrocnemius* der Mäuse der Trainingsstudie. A) Originalblots für H3K4me2, H3 gesamt sowie α -Tubulin und Memcode-Färbung. B) Quantifizierung des H3K4-spezifischen Dimethylierungsmusters. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf H3 gesamt. C) zeigt das H3K4-spezifische Dimethylierungsmuster des *M. gastrocnemius* in der Gruppe der Nichtläufer (normiert auf 1) und der Gruppe der Läufer. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf H3 gesamt.

Mit beiden Normalisierungsmethoden wurde eine reduzierte H3K4-Dimethylierung in der Gruppe der Läufer beobachtet. Aufgrund der hohen Standardabweichungen wurde jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz erreicht.

5. Diskussion

5.1. Gewichtsbestimmung

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere hatten bei Beendigung des Trainingsexperimentes ein Alter von 18 Wochen (126Tage) und zeigten in der Gruppe der Nichtläufer ein durchschnittliches Gewicht von 30,8g (+/- 1,53g) und in der Gruppe der Läufer von 29,85g (+/- 4,50g). Dieser Gewichtsunterschied zwischen den untersuchten Gruppen ist statistisch nicht signifikant, so dass angenommen werden kann, dass das Laufbandtraining keinen Einfluss auf die generelle Gewichtsentwicklung der Mäuse hat. Die untersuchten Tiere wiesen zudem im Alter von 18 Wochen ein ähnliches Körpergewicht wie in vorangegangenen Untersuchungen anderer Autoren auf: In der Arbeit von Fekete et al. (1933) wurde neben der Körperlänge auch das Körpergewicht untersucht. Die untersuchten männlichen Tiere zeigten hier in einem Alter von 91 Tagen ein Gewicht von 28,4g, im Alter von 121 Tagen 27,63g und im Alter von 151 Tagen 30,52g. In der Arbeit von Oldknow et al. (2015) zeigten die dort untersuchten C57BL/6 Mäuse im Alter von 120 Tagen ein durchschnittliches Gewicht von 30,18g (+/- 0,946g). Die C57BL/6 Mäuse von Jackson Laboratories zeigen im Alter von 26 Wochen ein durchschnittliches Gewicht von 31,96g (+/- 2,51g). Die Gewichtsentwicklung der hier untersuchten Mäuse ist somit mit vorher erhobenen Daten vergleichbar, was nahelegt, dass die Gewichtszunahme in beiden Tiergruppen regelgerecht erfolgte.

Im Zusammenhang mit der Gewichtsentwicklung unter Lauftraining ist auch die Studie von Oztasan et al. (2007) interessant. Hier wurde ein acht Wochen andauerndes Ausdauertraining (Laufbandtraining, fünf Tage die Woche) mit adulten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Dabei zeigten die Läufer am Ende des Experimentes ein durchschnittliches Gewicht von 268g (+/- 38g) und die Gruppe der Nichtläufer von 237g (+/- 46g). Dieser Unterschied in der Gewichtszunahme war ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit mit einem durchschnittlichen Gewicht von 30,89g (+/- 1,53g) in der Gruppe der Nichtläufer und 29,85g (+/- 4,50g) in der Gruppe der Läufer nicht statistisch signifikant, was ebenfalls dafür spricht, dass ein regelmäßiges Lauftraining über mehrere Wochen die Gewichtsentwicklung gesunder Nager im Wachstum nicht beeinflusst.

5.2. Herzfrequenzmessung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Herzfrequenz bei allen acht Mäusen einen Tag nach Ablauf des Trainingsexperimentes fünf Mal hintereinander bestimmt. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Läufer eine geringe Tendenz hin zu einer Reduktion der Ruheherzfrequenz im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer. Die physiologische Ruheherzfrequenz der Maus liegt zwischen 500 und

700 Schlägen pro Minute (Kramer et al., 1993). Die Ergebnisse unserer Messungen stimmen mit diesen Werten überein.

Die Tendenz zur Reduktion der Ruheherzfrequenz bei den Läufern könnte eine Anpassung an das Ausdauertraining widerspiegeln. Evangelista et al. (2003) untersuchten, wie sich Schwimmtraining auf die Herzfunktion auswirkt. Die Mäuse absolvierten dabei ein 60- bzw. 90-minütiges Schwimmtraining ein- bis zweimal am Tag, belastet mit 0/2/4% des Körpergewichtes an zusätzlichem Gewicht, für vier bzw. sechs Wochen. Dabei zeigte sich, dass in den trainierten Gruppen die Ruheherzfrequenz um 8-18% sank. Diesen Effekt konnten wir in unserem Trainingsexperiment nicht erzielen, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass das durchgeführte Laufbandtraining für die Mäuse nicht so anstrengend wie das von Evangelista et al. (2003) durchgeführte Schwimmtraining mit zusätzlichen Gewichten war.

Kaplan et al. (1994) untersuchten ebenfalls die Auswirkungen eines Schwimmtrainings auf die Herzfrequenz bei adulten, jedoch weiblichen C57BL6-Mäusen. Diese absolvierten ein vierwöchiges Schwimmtraining mit zwei täglichen Schwimmeinheiten à 90 min. Die Autoren analysierten, wie sich die Herzfrequenz während des Schwimmtrainings entwickelt und wiesen im Verlauf des vierwöchigen Trainings eine Reduktion um 20% (100bpm) nach. Die Ruheherzfrequenz konnte in der Kontrollgruppe jedoch nicht zuverlässig bestimmt werden.

DeAngelis et al. (2004) untersuchten den Einfluss eines Ausdauertrainings auf die Funktion des Herzens bei adulten männlichen C57BL6/J-Mäusen. Das Training bestand aus einem Laufbandtraining (1h/Tag, 5d/Woche) über vier Wochen. Dabei ergab sich, dass dynamisches Ausdauertraining zu einer Ruhebradykardie und zu einer Verbesserung der baroreflexvermittelten Tachykardie führt. Die Ruheherzfrequenz lag bei den untrainierten Mäusen bei 591bpm (+/- 8bpm) und bei den trainierten Tieren bei 505bpm (+/- 9bpm). Diese Veränderungen beruhen vermutlich auf einem erhöhten Vagotonus und einer verminderten Aktivität des Sympathikus (siehe auch Mohan et al. 2000, und Danson et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit lag die durchschnittliche Ruheherzfrequenz in der Gruppe der Nichtläufer bei 577,50bpm (+/- 78,44bpm) und in der Gruppe der Läufer bei 569,55bpm (+/- 53,49bpm), wurde also durch das Laufen nicht so deutlich reduziert wie bei den von DeAngelis et al. (2004) beschriebenen Tieren. Gründe hierfür könnten die höhere Trainingsfrequenz von fünf Tagen pro Woche bei DeAngelis et al. (2004) verglichen mit den in dieser Arbeit durchgeführten drei Tagen pro Woche sein. Die Häufigkeit der Trainingseinheiten könnte also eventuell für die kardiale Anpassung bezogen auf die Ruheherzfrequenz entscheidender sein, als die Trainingsdauer (vier im Vergleich zu zehn Wochen).

5.3. Kraftmessung

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Grip Strength* bei allen acht Mäusen an vier Tagen je fünf Mal hintereinander bestimmt, um die Maximalkraft der Mäuse zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass die ermittelte *Grip Strength* im Verlauf der Messtage sowohl in der Gruppe der Nichtläufer als auch in der Gruppe der Läufer abnahm. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl bei der Messung der *Grip Strength* der isolierten Vorderextremität als auch in der Kombination der beiden Extremitäten. Eine Erklärung könnte sein, dass die *Compliance* der Mäuse mit jeder Messung sank. Auch innerhalb der Messreihen herrschte eine starke Schwankungsbreite. Dies machte die Bestimmung der Maximalkraft schwierig und stellte ein methodisches Hindernis dar. Die starke Schwankungsbreite innerhalb der einzelnen Messtage zeigt, dass es sich bei der Kraft, die von der Maus zum Messzeitpunkt ausgeübt wird, in vielen Fällen vermutlich nicht um die Maximalkraft handelt, da man dann davon ausgehen würde, dass diese im Verlauf der Messungen gleich bleibt oder sich stetig verringert. Dies war definitiv nicht der Fall - es war innerhalb der Messreihen kein Trend wie z.B. eine kontinuierliche Abnahme oder Zunahme erkennbar. Somit scheint zur Beantwortung der Frage, ob das durchgeführte Laufbandtraining einen Effekt auf die Muskelkraftentwicklung hat, die Methode der *Grip Strength*-Messung in dieser Form so nicht geeignet zu sein.

5.4. Längenmessung

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere (C57BL/6NCrl) hatten in der Gruppe der Nichtläufer nach Beendigung der Trainingsperiode im Alter von 126 Tagen eine durchschnittliche nasoanale Länge von 79,7mm und in der Gruppe der Läufer von 77,5mm. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant, so dass angenommen werden kann, dass das Lauftraining keinen Einfluss auf das Längenwachstum der Tiere hat. Insgesamt waren die in dieser Arbeit untersuchten Tiere jedoch im Vergleich zu Angaben in der Literatur deutlich kleiner: In einer Studie von Fekete et al. (1933) wurde u.a. die Entwicklung der nasoanalen Länge von C57 Black-Mäusen untersucht (erst 1937 wurde der Stamm der C57 Black in 2 Sublinien aufgeteilt: C57BL/6 und C57BL/10. 1957 dann in C57BL/6N und C57BL/6J.). Hierbei zeigte sich, dass die Entwicklung im Längenwachstum bei männlichen Tieren mit 91 Tagen abgeschlossen ist. Die untersuchten männlichen Tiere zeigten in diesem Alter eine nasoanale Länge von 94,0mm. Vergleicht man diese Daten mit den in dieser Arbeit gewonnenen, so wird die geringere Länge der von uns untersuchten Tiere deutlich. In der Arbeit von Di Masso et al. (2004) zeigten die dort untersuchten CBi-Mäuse (C57BL/Cbi) der Kontrollgruppe im Alter von 150 Tagen eine nasoanale Länge von 104,8mm (siehe Tab.15).

Studie	Alter	Nasoanale Länge
<i>Fekete et al. (1933), C57BL</i>	91 Tage	94,0mm
	121 Tage	91,6mm
	151 Tage	96,4mm
<i>Di Masso (2004), CBI</i>	150 Tage	104,8mm
<i>Vorliegende Arbeit</i>	126 Tage	NL: 79,7mm L: 77,5mm

Tab.15: Aufgeführt die nasoanale Länge bezogen auf das Alter der in den verschiedenen Studien untersuchten Mäusen. NL= Nichtläufer, L = Läufer.

Die beobachteten Differenzen könnten auf generelle Unterschiede, welche durch die verschiedenen Subpopulationen der C57BL zustande kommen, zurückzuführen sein.

5.5. Körperfettbestimmung/Lee-Index und Gewichtsbestimmung des gonadalen Fettdepots als Maß für den Gesamtkörperfettanteil

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere zeigten im Alter von 126 Tagen in der Gruppe der Läufer einen Lee-Index von 0,39 und in der Gruppe der Nichtläufer von 0,38. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant, so dass angenommen werden kann, dass eine möglicherweise durch das Lauftraining induzierte Veränderung des Gesamtkörperfettanteils mit Hilfe des Lee-Indexes nicht nachgewiesen werden kann. Diese Ergebnisse sind jedoch kritisch zu betrachten: In der Studie von Rogers et al. (1980) wurde der Körperfettanteil von normalgewichtigen und übergewichtigen Mäusen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Berechnung des Lee-Index' lediglich bei übergewichtigen Mäusen eine Korrelation mit dem Körperfettanteil zeigt. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Gruppe der Läufer trotz unverändertem Lee-Index eine leichte Reduktion des Gewichts des linken gonadalen Fettdepots relativ zum Körpergewicht verglichen mit den Nichtläufern.

Die in der Literatur verfügbaren Werte zum Lee-Index sind auf Grund der Verwendung verschiedener Einheiten, welche nicht immer angegeben werden, sehr unterschiedlich, sodass ein direkter Vergleich erschwert wird (adulte männliche SWISS-Mäuse 3,01 (+/-0,02) (Silva et al., 2015), bei Ratten gilt ein Wert <0,300 als normal (Malafaia et al., 2013)).

Rogers et al. (1980) untersuchten den Körperfettanteil von normalgewichtigen und übergewichtigen Mäusen. Hierbei nutzten sie sowohl den Lee-Index, als auch eine Gewichtsbestimmung des rechten gonadalen Fettdepots und verglichen diese Methoden mit der technisch aufwendigeren Methode der direkten Messung des Körperfettanteils mittels Trocknen und Fettextraktion. Dabei fanden die Autoren Hinweise darauf, dass die Berechnung des Lee-Indexes zumindest bei normalgewichtigen Mäusen nicht so akkurat wie die Bestimmung des

Körperfettes mittels des Gewichts der gonadalen Fettdepots sein könnte. Auch die Daten von Oldknow (2015) sprechen dafür, dass die Analyse des Gewichts der gonadalen Fettdepots als Einzelbestimmung für das Gesamtkörperfett die Methode der Wahl sein könnte.

Oztasan (2007) erzielte ähnliche Ergebnisse: Auch in dieser Arbeit gab es Hinweise darauf, dass der Lee-Index bei normalgewichtigen Ratten durch ein Lauftraining induzierte Veränderungen des Körperfettanteils nicht aufzeigen kann.

2007 zeigte zudem Oztasan, dass das Gewicht des linken Fettdepots im Rahmen eines achtwöchigen Laufbandtrainings abnimmt. Zudem berechneten die Autoren das proportionale Gewicht des linken gonadalen Fettdepots relativ zum Gesamtkörpergewicht ($(\text{Gewicht linkes gonadales Fettdepot (g)}/\text{Körpergewicht (g)}) \cdot 100$) und stellten fest, dass sich dieses analog zur Reduktion des absoluten Gewichts des linken gonadalen Fettdepots im Rahmen des achtwöchigen Laufbandtrainings ebenfalls verringert.

Somit ist es nicht überraschend, dass auch in der hier vorliegenden Arbeit kein Effekt des Lauftrainings auf den Lee-Index nachgewiesen werden konnte, da die für das Trainingsexperiment verwendeten Mäuse sich alle im Bereich des Normalgewichts befanden. Zudem wäre es durchaus möglich, dass das Lauftraining gleichzeitig einen höheren Anteil an Muskelmasse und einen geringeren Anteil an Körperfett induziert haben könnte, was sich im Lee-Index nicht notwendigerweise widerspiegeln würde.

5.6. Knochenvermessung der Tibia

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Gruppe der Nichtläufer eine durchschnittliche Gesamtlänge (GL) der Tibia von 1,88cm und die Gruppe der Läufer von 1,92cm. Diese Messwerte entsprechen den in vorherigen Studien erhobenen Daten: Fekete et al. (1933) bestimmten die GL der Tibia. Die untersuchten männlichen Tiere zeigten dabei im Alter von 91 Tagen eine GL von 1,756cm. Im Alter von 121 Tagen zeigten sie eine GL von 1,678cm und im Alter von 151 Tagen von 1,726cm. Die anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Messstrecken wurden in der Arbeit von Fekete et al. (1933) nicht untersucht. Di Masso et al (2004) untersuchten u.a. die GL der Tibia. Dabei zeigten die untersuchten männlichen C57BL/6-Mäuse im Alter von 150 Tagen eine durchschnittliche GL von 1,739cm (+/- 0,067cm). Auch Hooper (1977) untersuchte u.a. die GL der Tibia und konnte dabei eine durchschnittliche GL von 1,653cm im Alter von 70 Tagen bei männlichen Q-Strain-Mäusen feststellen. Sommerville et al (2004) untersuchten u.a. die Veränderungen des kortikalen Knochens der Tibia von C57BL/6-Mäusen im Wachstum. Dabei wiesen die Autoren nach, dass die skeletale Entwicklung im Alter von 6 Monaten abgeschlossen

ist. Die adulten männlichen Mäuse wiesen dann eine GL von 1,893cm (+/- 0,056cm) auf (Tab.16).

Studie	Alter	GL
<i>Fekete et al. (1933), C57BL6</i>	91 Tage	1,756cm
	121 Tage	1,678cm
	151 Tage	1,726cm
<i>Di Masso et al (2004), CBI</i>	150 Tage	1,739cm
<i>Sommerville et al (2004), C57BL/6</i>	168 Tage	1,893cm
<i>Hooper (1977), Q-Strain Mice</i>	70 Tage	1,653cm
<i>Vorliegende Studie</i>	126 Tage	NL: 1,88cm, L: 1,92cm

Tab.16: Aufgeführt die GL der Tibia bezogen auf das Alter der in den verschiedenen Studien untersuchten Mäusen. NL= Nichtläufer, L = Läufer.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigten somit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der GL zwischen Läufern und Nichtläufern. Dies ist nicht überraschend: Mosley et al. (1998) konnten zwar an Hand eines Ratten-Modells zeigen, dass sich die Ulna einer funktionellen Anpassung auf dynamische axiale Belastung über zwei Wochen unterzieht. Die auf die Ulna wirkende Kraft bestand dabei v.a. aus Kompression und Biegung. Die belastete Ulna war nach Ablauf der zwei Wochen signifikant kürzer, zudem zeigte sie eine reduzierte periostale Expansion am proximalen Ende und eine erhöhte periostale Knochenproduktion distal.

Das in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Trainingsexperiment zeigt vornehmlich eine vermehrte Belastung im Rahmen der natürlichen Lokomotion. Diese besteht jedoch zu ca. 90% aus einer axialen Belastung durch mediolaterale Biegung und nur einem sehr geringen Anteil an axialer Kompression, wodurch es, wie von Mosley et al. (1998) festgestellt, auch nicht zu einer Verkürzung der GL kommt.

Bei der osteometrischen Analyse der Tibia der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere ergab sich, dass in der Gruppe der Läufer die KD50% höher, die BP aber niedriger war. Aufgrund bereits publizierter Daten von Souminen et al. (2017) und Iazard et al (2016) war dies auch zu erwarten: Souminen et al. (2017) untersuchten die Auswirkung eines *High-intensity strength*- und Sprinttrainings auf die Knochenstärke der Tibia bei älteren Männern. Dabei fanden die Autoren eine signifikante Zunahme der Ausdehnung und Dichte der mittleren tibialen Struktur (KD 50%). Zusätzlich wurden in dieser Arbeit auch die distale Tibia (BD) untersucht, wobei jedoch kein Effekt auf die Knochenstruktur und -stärke festgestellt werden konnte. Im

distalen Anteil des Knochens steht die kompressive Kraft in Relation zu einer höheren trabekulären volumetrischen Knochen-Mineral-Dichte (Souminen et al., 2017). Strukturelle Adaptationen bei Kraft- und Sprinttraining zeigten sich in einer höheren kortikalen Dicke, vermutlich auf Grund einer höheren richtungsspezifischen Biegunskraft. Izard et al. (2016) untersuchten bei Männern im Alter von 21 Jahren (+/-3 Jahre) die Auswirkung eines kurzen (zehn Wochen), anstrengenden Trainings (Militärtraining) auf die Knochendichte und Geometrie der Tibia. Die Autoren konnten nachweisen, dass die Knochendichte (distal und Epiphyse) signifikant anstieg. Die diaphysäre Knochengeometrie und Knochenstärke erhöhte sich ebenfalls signifikant. Mechanische Belastung führt somit zu einer Verbesserung der Knochenstärke der Tibia durch eine erhöhte Dichte und periostale Expansion (Izard et al., 2016). Die Bildung von neuem Knochen ist direkt proportional zur Belastung. Die Tibia erfährt eine hohe Belastung bei der Lokomotion.

Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten stehen mit diesen Ergebnissen im Einklang: Es konnte bei den Läufern ebenfalls eine Anpassung der Knochendichte im Bereich der KD 50% (Diaphyse des Knochens), die sich vermutlich auch auf eine Zunahme der Dicke der Kortikalis zurückführen lässt, nachgewiesen werden. Dies könnte auf den großen Umfang und / oder die hohe Belastung des Trainings zurückzuführen sein. Die fehlende Zunahme der BD könnte daraus resultieren, dass es sich bei dem erfolgten Training eher um eine Belastung durch Biegunskräfte als durch vertikale Kompressionskräfte handelt.

Die beobachtete Verminderung der BP lässt sich vermutlich auf die eher trabekuläre Struktur im Bereich der proximalen Epiphyse zurückführen. Diese hält hohen axialen Kompressionskräften stand, sodass es hier nicht zu einer Zunahme der Dichte kommt. Ähnlich wie in der Studie von Mosley et al. (1998) könnte es sich hierbei ebenfalls um eine reduzierte periostale Expansion handeln, ausgelöst durch die axiale Kompression des Laufbandtrainings mit Steigung.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der KD50% durch das Laufen lässt sich durch die axiale Belastung im Rahmen des Laufbandtrainings mit Steigung durch eine Verstärkung der Kortikalis der Diaphyse, wie in vorangegangenen Studien bereits dargestellt, erklären: Pang et al. (2010) untersuchten, wie sich Laufband-Training (sechs Monate) auf die Knochendichte und Geometrie der Tibia bei Schlaganfallpatienten auswirkt. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Dicke der Kortikalis der Tibia durch das Laufen erhöht. Regelmäßiges Belastungstraining führt folglich zu einer effektiven Förderung der Knochendichte bei älteren Patienten.

In Bezug auf die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind jedoch weitere Untersuchungen die Knochengeometrie betreffend nötig, um die Veränderungen im Bereich der Kortikalis der

Diaphyse und auch der periostalen Expansionen im proximalen und distalen Bereich der Tibia zu verifizieren.

5.7. Herzvermessung / Herzgröße und Herzgewicht

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen ein Laufbandtraining auf die Herzgröße und das Herzgewicht und somit auf den Hypertrophiegrad des Herzens hat, wurden von allen acht Mäusen die Herzen vermessen und die Dicke der Herzwände bestimmt. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Läufer eine Tendenz zur Reduktion sowohl des Herzgewichts als auch der Herzgröße und der Ventrikelwand-Dicke.

Gibb et al. (2016) führten ebenfalls ein Lauftraining bei Mäusen durch und geben als Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht in der Gruppe der C57BL/6J-Mäuse bei den untrainierten Tieren 4,40mg/g (+/- 0,4mg/g) und in der Gruppe trainierten Tiere 4,50mg/g (+/- 0,4mg/g) an. In der vorliegenden Arbeit betrug das Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht in der Gruppe der Nichtläufer 4,90mg/g (+/- 0,37mg/g) und in der Gruppe der Läufer 4,69 mg/g (+/- 0,82mg/g). Die Werte lagen somit, verglichen mit der Studie von Gibb et al. (2016), im selben Bereich und es ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

In der Studie von Evangelista et al. (2003) wurde die Auswirkung eines vier-, bzw. sechswöchigen intensiven Schwimmtrainings auf die kardiale Hypertrophie untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich das absolute Herzgewicht in der Gruppe der trainierten C57BL/6-Mäuse um 14-25% im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren erhöhte. Zudem zeigte sich eine Erhöhung im Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht, welche vornehmlich durch eine Erhöhung im Gewicht des linken Ventrikels bedingt war. Dies zeigt, dass das Schwimmtraining im Vergleich zum Lauftraining eher zu einer Hypertrophie des Herzmuskels führt, bzw. dass ein Ausdauertraining bei Mäusen vergleichsweise intensiv sein muss, um messbare Anpassungsreaktionen auf kardialer Ebene zu induzieren.

Gibb et al. (2016) untersuchten zudem, inwieweit sich C57BL/6J- und FVB/NJ-Mäuse als Modell für kardiale Anpassungen bei einem Laufbandtraining eignen. Dabei konnten die Autoren zeigen, dass FVB/NJ-Mäuse nach einer Trainingsphase im Gegensatz zu C57BL/6J-Mäusen sowohl eine Steigerung in ihrer Leistungskapazität als auch eine Zunahme der Herzgröße zeigen. Dabei zeigten FVB/NJ-Mäuse ohne Training ein durchschnittliches Herzgewicht von 115,40mg (+/- 6,10mg) und nach dem Training von 130,50mg (+/- 9,10mg), C57BL/6J-Mäuse zeigten dagegen in der Gruppe der untrainierten Tiere ein durchschnittliches Herzgewicht von 123,70mg (+/- 15,00mg) und in der Gruppe der trainierten Tiere 1 von 18,00mg (+/- 13,00mg). Auch das Verhältnis Herzgewicht zu Tibialänge war bei den FVB/NJ-Mäusen (7,30mg/mm +/-

0,40mg/mm bei den trainierten und 6,30mg/mm +/- 0,30mg/mm bei den untrainierten Tieren) im Gegensatz zu den C57BL/6J-Mäusen (6,60mg/mm +/- 0,70mg/mm bei den trainierten und 6,90mg/mm +/- 0,90mg/mm bei den untrainierten Tieren) nach dem Training erhöht. Das Verhältnis Herzgewicht zu Tibialänge wird häufig als Maß für Anpassungsreaktionen an das Training eingesetzt. Mit Hilfe dieses Verhältnisses lässt sich aufzeigen, ob es zu einem physiologischen Herzwachstum als kardiometabolische Anpassung an das Training kommt (Maillet et al. 2013). Somit lässt sich darauf schließen, dass die kardiale Anpassung von C57BL/6-Mäusen an das Laufbandtraining eher gering war. Dies legen auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten nahe: Bei den verwendeten C57BL/6N-Mäusen zeigte sich in der Gruppe der Läufer sogar eine Tendenz zur Reduktion im Verhältnis Herzgewicht zu Tibialänge. Dieses lag in der Gruppe der Nichtläufer bei 8,18mg/mm (+/- 1,16mg/mm) und in der Gruppe der Läufer bei 7,10mg/mm (+/- 0,70mg/mm).

Das Herzgesamtgewicht lag in der hier vorgestellten Studie in der Gruppe der Nichtläufer bei 153,47mg (+/- 17,50mg) und in der Gruppe der Läufer bei 138,25mg (+/- 17,23mg). Diese Reduktion des Herzgewichtes spiegelt sich sowohl im Gewicht der Atrien (in der Gruppe der Nichtläufer 19,55mg (+/- 9,14mg) und in der Gruppe der Läufer 17,35mg (+/- 4,37mg)), als auch im Gewicht der Ventrikel wider. Dieses lag in der Gruppe der Nichtläufer bei 130,65mg (+/- 7,92mg) und in der Gruppe der Läufer bei 112,47 mg (+/- 13,52 mg). Untersucht man das Gewicht der Ventrikel etwas genauer, zeigt sich insbesondere im Gewicht des rechten Ventrikels eine deutliche Tendenz zur Reduktion des Ventrikelgewichtes. In der Gruppe der Nichtläufer betrug das Gewicht des rechten Ventrikels 20,5mg (+/- 7,4 mg) und in der Gruppe der Läufer 13,85mg (+/- 3,16mg), wohingegen das des linken Ventrikels mit Septum in der Gruppe der Nichtläufer 101,15mg (+/- 7,19mg) und in der Gruppe der Läufer 90,2mg (+/- 8,46mg) betrug. Bei der Messung der Dicke der Ventrikel- und der Septumwände zeigte sich für die Wand des rechten Ventrikels in der Gruppe der Nichtläufer eine Dicke von 0,04cm (+/- 0,02cm) und in der Gruppe der Läufer 0,04cm (+/- 0,01cm), für die Wand des linken Ventrikels ergab sich für die Gruppe der Nichtläufer eine Dicke von 0,11cm (+/- 0,01cm) und für die Gruppe der Läufer eine Dicke von 0,09cm (+/- 0,01cm). Einzig bei der Dicke des Septums zeigte sich in der Gruppe der Läufer (0,17cm +/- 0,03cm) eine höhere Dicke als in der Gruppe der Nichtläufer (0,14cm +/- 0,03cm). Auf Grund des deutlich niedrigeren Gewichts und der niedrigeren Dicke der Ventrikelwand des rechten Ventrikels liegt der Schluss nahe, dass es hier zu einer Dilatation des rechten Ventrikels auf Grund des Trainings gekommen sein könnte. Auch die Reduktion der Herzwanddicke scheint dies zu bestätigen. Interessant ist die Zunahme der Dicke des Ventrikelseptums. Dies deutet auf eine Zunahme der Muskelfasern, also einer Hypertrophie des

Herzen hin. Es findet sich also eine exzentrische Vergrößerung des Herzens – eine Dilatation der Ventrikel und eine Hypertrophie der Herzmuskelwand (Septum), welche als Adaption eines Herzens an sportliche Belastung beschrieben wird (Übersicht bei Böhm, 2000).

5.8. Bestimmung des Gewichts einzelner Muskeln

Bei der Untersuchung des Muskelgewichtes der in dieser Arbeit untersuchten Mäuse relativ zum Körpergewicht zeigte sich kein statistischer Unterschied zwischen der Gruppe der Nichtläufer und der Gruppe der Läufer. Allerdings konnte eine Tendenz zur Reduktion des jeweiligen Gewichts in der Gruppe der Läufer insbesondere bei den großen Muskeln *M. gastrocnemius* und *M. quadriceps* und zusätzlich auch beim Zwerchfell festgestellt werden.

Soffe et al. (2015) untersuchten den Einfluss eines progressiven Lauftrainings über zehn Wochen auf die Muskelmasse bei jungen (15-25 Wochen) und alten (107-117 Wochen) C57Bl/6J Mäusen. Dabei beobachteten die Autoren eine deutliche Zunahme der Masse des *M. soleus* bei beiden Altersgruppen sowie der Masse des *M. quadriceps* und des *M. gastrocnemius* bei jungen Mäusen. Für den *M. soleus* konnte in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Masse durch Training festgestellt werden. Dies kann zum einen in der Art des Trainings begründet sein: In der vorliegenden Arbeit wurde ein koordiniertes Laufbandtraining, in der Arbeit von Soffe et al. (2015) ein *voluntary wheel run* mit sich sukzessiv erhöhendem Widerstand durchgeführt, zum anderen könnte auch die Präparationsgenauigkeit auf Grund der sehr geringen Größe des *M. soleus* eine Rolle spielen. Auch die Zunahme der Muskelmasse des *M. quadriceps* und *M. gastrocnemius* konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, hier zeigt sich sogar eher eine Tendenz zur Reduktion des Muskelgewichtes. Bei dem von Soffe et al. (2015) durchgeführten Training war möglicherweise die Kraftkomponente höher als der in dieser Arbeit durchgeführten Studie, was dazu geführt haben könnte, dass die Autoren einen hypertrophieinduzierenden Effekt beobachten konnten.

5.9. Lebergewicht und leberspezifische Parameter

Im Zuge der Untersuchung des Lebergewichts der hier untersuchten Mäuse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Nichtläufer und der Gruppe der Läufer. Auch bei der Untersuchung der leberspezifischen Parameter fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Jedoch zeigen sich, insbesondere in der Alanin-Aminotransferaseaktivität und der Cholesterolkonzentration, geringere Werte in der Gruppe der Nichtläufer verglichen mit der Gruppe der Läufer. Aus diesen Berechnungen wurde Maus 110 (NL) jedoch herausgenommen, da sie deutliche Abweichungen

nicht nur in den leberspezifischen Parametern, sondern auch in der weiteren blutchemischen und hämatologischen Untersuchung zeigte.

In einer Studie von Zelber-Sagi et al. (2014) wurde der Einfluss von Ausdauertraining beim Menschen auf eine nicht alkoholinduzierte Fettleber untersucht. Dabei zeigte sich, dass nach einem 3-monatigen Training eine Verbesserung des Leberfettgehaltes erreicht werden kann, verbunden mit einem geringeren Cholesterolverwert. Zu denselben Ergebnissen sind Schultz et al. (2012) bei ihrer Untersuchung der Effekte von Schwimmtraining bei Mäusen, ebenfalls mit einer nicht durch alkoholinduzierten Fettleber gekommen. Dass sich in der hier vorgelegten Studie kein Unterschied, bzw. sogar ein leicht erniedrigter Cholesterolverwert (NL 73,3mg/dl +/- 11,54mg/dl; L 80mg/dl +/- 17,10mg/dl) in der Gruppe der Nichtläufer zeigte, liegt zum einen vermutlich an der Dauer des Trainingsexperimentes (10 Wochen im Vergleich zu 3 Monaten), als auch an der Tatsache, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuse nicht an einer Fettleber litten.

Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Trainingsexperiment konnte zudem keine signifikante Veränderung des Lebergewichts und der leberspezifischen Parameter festgestellt werden. Es ist jedoch durchaus möglich, dass ein zeitlich länger dauerndes Trainingsexperiment mit einer höheren Laufgeschwindigkeit und somit erhöhten Belastung der Tiere zu einer Reduktion des Lebergewichts auf Grund eines reduzierten Gesamtkörperfettgehaltes und somit auch reduzierten Leberfettgehaltes mit Änderungen der leberspezifischen Parameter führen könnte.

5.10. Gewichtsbestimmung und molekularbiologische Analyse der gonadalen Fettdepots

Die Gewichtsbestimmung der gonadalen Fettdepots wurde u.a. zur Bestimmung des Gesamtkörperfettanteils aber auch zur Untersuchung der Auswirkungen des durchgeführten Ausdauertrainings durchgeführt. 2007 zeigte Oztasan et al., dass das Gewicht des linken Fettdepots im Rahmen eines achtwöchigen Laufbandtrainings abnimmt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls eine Reduktion im Gesamtgewicht der gonadalen Fettdepots innerhalb der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer. Bei der Untersuchung der Einzelgewichte zeigte sich wie auch in der Studie von Oztasan et al. (2007), eine Reduktion des Gewichts des linken gonadalen Fettdepots innerhalb der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer. Für das rechte gonadale Fettdepot konnte keine Tendenz zur Reduktion zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden. Auf Grund der Reduktion des linken gonadalen Fettdepots kann daher von einem Trainingseffekt ausgegangen werden.

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen das durchgeführte Ausdauertraining auf die Genexpression der Zellen der gonadalen Fettdepots besitzt, wurden diese im Anschluss an die Gewichtsbestimmung aufgereinigt und mittels qRT-PCR untersucht. Dabei wurde insbesondere die Expression solcher Gene analysiert, deren Produkte in Bezug auf den Fettstoffwechsel relevant sind und bei denen die Ergebnisse des Zytokin-Arrays (vgl. 4.1.11) auf potentielle Unterschiede zwischen Läufern und Nichtläufern hingewiesen hatten. Hierbei zeigte sich v.a. bei der Untersuchung der Expression der für Lipocalin-2 und GM-CSF kodierenden Gene eine deutliche Reduktion in der Gruppe der Läufer – im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer. Aber auch für die Gene, die für Leptin und Angiopoietin-2 kodieren, zeigte sich eine Reduktion in der Gruppe der Läufer verglichen mit der Gruppe der Nichtläufer. Bei der Analyse der *Lipocalin-2*-Expression wurde Maus 110 (NL) aus der Berechnung herausgenommen, was zu einer deutlichen Reduktion der Standardabweichung in der Gruppe der Nichtläufer führte. Dies wurde vorgenommen, da Lipocalin-2 bei einer akuten oder chronischen Schädigung der Leber hochreguliert wird – und die Expression des entsprechenden Gens mit dem Grad des Entzündungsgeschehens korreliert (Wieser et al., 2015). Auf Grund der Veränderungen bei den leberspezifischen Parametern (vgl.4.1.9) lag der Schluss nahe, dass Maus 110 (NL) durch einen möglichen inflammatorischen Prozess, welcher die Leber betreffen könnte, ebenfalls veränderte Werte in Bezug auf die *Lipocalin-2*-Expression aufweisen könnte. Lipocalin-2 dient als Transportprotein, welches Fette binden kann und dadurch die Mobilisierung von Fettreserven reguliert. Talebi-Garakani et al. (2012) untersuchten den Effekt von Training auf Lipocalin-2 bei diabetischen Ratten. Dabei absolvierten die Tiere ein einmaliges Ausdauertraining auf einem Laufband und wurden direkt im Anschluss, 4h und 24h nach absolviertem Training euthanasiert und das Fettgewebe untersucht. Dabei beobachteten die Autoren, dass die Lipocalin-2-Konzentration sowohl 4- als auch 24h im Anschluss an das Training reduziert war, was sie auf die anti-inflammatorische Wirkung des Trainings zurückführten. Die hier untersuchten Mäuse der Gruppe der Läufer, zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion der *Lipocalin-2*-Expression im Fettgewebe, was den Schluss nahelegt, dass regelmäßiges Training auch dauerhaft die Lipocalin-2-Menge reduzieren kann.

Leptin ist ein Adipokin welches sich im Fettgewebe findet und an Inflammationsprozessen beteiligt, sowie für das Hunger- und Sättigungsgefühl verantwortlich ist. Eine durch Training induzierte verminderte *Leptin*-Expression wurde von verschiedenen Autoren beobachtet und scheint mit einer Reduktion der Fettgewebemenge einherzugehen. Kommt es im Zuge des Trainings nicht zu einer Reduktion der Fettgewebes konnten einige Autoren vielmehr einen Anstieg der Leptin-Konzentration und auch –Expression feststellen. Von einigen Autoren konnte

jedoch auch eine Erniedrigung der Leptin-Konzentration im Anschluss an ein extremes und akutes Training nachgewiesen werden (Übersicht bei Benatti et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte eine leichte Reduktion der *Leptin*-Expression festgestellt werden, sodass sich hier ebenfalls ein Effekt des durchgeführten Trainingsexperimentes nachweisen lässt.

Dem Zytokin GM-C-SF wird eine inflammatorische Wirkung zugesprochen, welche sich insbesondere auch auf das Fettgewebe bezieht. Das Verteilungsmuster im Fettgewebe ist dabei unterschiedlich, am häufigsten findet man GM-C-SF im mesenterialen Fett (Kim et al., 2008). Mäuse mit einem Knock-out für GM-C-SF zeigen eine erniedrigte Expression der für verschiedene proinflammatorische Zytokine kodierenden Gene im Fettgewebe (Kim et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Gruppe der Läufer eine deutlich geringere Expression von *GM-C-SF* im gonadalen Fettdepot ($0,26 \pm 0,14$), im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer ($1 \pm 1,39$). Dies legt den Schluss nahe, dass es durch das Ausdauertraining zu einer Senkung der Expression von *GM-C-SF* auf RNA-Ebene kam, wodurch eine anti-inflammatorische Wirkung erzielt wurde, bzw. die inflammatorische Wirkung von GM-C-SF herabgesetzt wurde.

Lee (2018) untersuchte in einer Studie mit männlichen C57BL/6 Mäusen, welchen Einfluss ein *voluntary wheel run*-Training u.a. auf das Fettgewebe (inguinal und gonadal) und die Expression von *Angiopoietin-2* besitzt. Dabei zeigte sich, dass im gonadalen Fettgewebe *Angiopoietin-2* nach Training hochreguliert wird. In der hier durchgeführten Trainingsstudie, zeigte sich für die Gruppe der Läufer jedoch ein geringerer Wert ($0,878 \pm 0,309$) im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer ($1 \pm 0,668$). Eine mögliche Erklärung hierfür, sind die sich voneinander unterscheidenden Trainingsregimes: In der Studie von Lee (2018) legte jede Maus im Durchschnitt 4,96 Km/Tag über sechs Wochen zurück, wohingegen in dem hier durchgeführten Training eine deutlich geringere Strecke auf dem Laufband absolviert wurde.

5.11. Blutanalyse und Zytokin-Array

Zur Untersuchung systemischer Einflüsse des Trainingsexperimentes wurde allen acht Mäusen nach Isofluranbetäubung retrobulbär Blut für eine hämatologische und blutchemische Bestimmung abgenommen.

Maus 110 wurde wiederum aus der Analyse der hämatologischen Untersuchung herausgenommen, da diese deutliche Abweichungen sowohl des roten als auch weißen Blutbildes aufwies. Bei Maus 110 zeigte sich ein deutlich erniedrigter Hämatokrit (14,9%) und eine Leukopenie (Reduktion der weißen Blutkörperchen) im Blutbild. Eine Leukopenie findet sich bei einem Infekt oder einer Erkrankung des Blutes und/oder des Rückenmarks, aber auch bei

Vergiftungen (Übersicht bei Ing, 1984). Der erniedrigte Hämatokrit könnte zusammen mit der erniedrigten Menge an weißen Blutkörperchen, sowie den erhöhten Leberparametern (vgl.4.1.9) ein Hinweis auf eine chronische Entzündung darstellen, welche eine Manifestation in der Leber haben könnte.

Training, insbesondere Ausdauertraining führt zu einer Erhöhung des Blutvolumens, insbesondere des Plasmas, wodurch der Hämatokrit leicht abnimmt. Mit fortgeschrittenem Training oder auch nach Höhentraining steigt der Anteil der Erythrozyten an, wodurch eine bessere Sauerstoffsättigung erreicht wird (Übersicht bei Friedmann, 2000). Bei den hier untersuchten Mäusen fand sich kein merklicher Unterschied im Hämatokrit zwischen der Gruppe der Läufer und der Gruppe der Nichtläufer. Bei der Betrachtung der weißen Blutkörperchen hingegen, zeigte sich eine signifikante Reduktion in der Gruppe der Läufer. Die weißen Blutkörperchen sind ein bedeutender Bestandteil des Immunsystems, sodass eine Reduktion mit einer Suppression der Entzündungsreaktion einhergeht (Lamina et al., 2011). Dieses Ergebnis lässt sich auch mit den vorherigen Ergebnissen dieser Arbeit (vgl.4.1.11) in Einklang bringen, bei denen das durchgeführte Trainingsexperiment ebenfalls eine anti-inflammatorische Wirkung auf die untersuchten Parameter aufzeigen konnte. Auch bei den blutchemischen Parametern ließen sich Tendenzen einer möglichen Trainingsanpassung erkennen. Bei der Gruppe der Läufer fanden sich höhere Blutcalciumwerte im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer. Calcium liegt im Blut zu 50% als freie Ca^{2+} -Ionen, zu 35% an Proteine (Albumin, Globulin) gebunden und zu 15% komplexgebunden (an Bicarbonat, Lactat, Citrat, Phosphat) vor. Die totale Calciumkonzentration im Blut ist von der Albumin-Konzentration abhängig. Eine Hypercalcämie kann zum einen durch einen Knochentumor, welcher zu einem erhöhten Knochenabbau und somit einer vermehrten Calciumfreisetzung führt, oder durch eine Schilddrüsenüberfunktion ausgelöst werden. Zudem der Calciummetabolismus durch das Parathormon der Nebenschilddrüse reguliert. Einige Studien konnten zeigen, dass Training zu einer Erhöhung des Parathormon-Spiegels führt. Dies könnte eine Erhöhung des Blut-Calciumspiegels bewirken, was in der betreffenden Studie jedoch nicht nachgewiesen wurde (Brown et al., 1977). Auch die Glukose- und Laktatkonzentrationen in der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer erhöht. Glukose ist ein wichtiger Energielieferant der Körpers. Laktat ist das Anion der Milchsäure und fällt als Endprodukt der anaeroben Glykolyse an. Eine Erhöhung des Laktatspiegels findet sich bei Hypoxie, ausgelöst durch z.B. eine Anämie oder eine Herzinsuffizienz, aber auch bei einer Minderperfusion des Gewebes (Gefäßverschluss). Nach schwerer Muskelarbeit ist die Laktatkonzentration kurzzeitig physiologisch erhöht, was jedoch beim Gesunden rasch reguliert wird (Übersicht bei Jacobs, 1986). Die in diesem

Trainingsexperiment zu sehende Erhöhung des Laktat- und auch Glukosespiegels lässt sich möglicherweise auf eine Stressreaktion der Tiere zurückführen: Die Gruppe der Läufer könnte den Transport der Käfige mit einer anstehenden Trainingssession in Zusammenhang gebracht haben, wodurch es zu einer vermehrten Ausschüttung von Laktat kam, und so ein Anstieg im Blutlaktatspiegel messbar war. Einige Autoren argumentieren, dass es neben den erhöhten Laktatwerten unter pathologischen Bedingungen auch eine physiologische stressinduzierte Laktatantwort gibt; ähnliches könnte für erhöhte Glukosewerte gelten (Übersicht bei Garcia-Alvarez et al., 2013).

Die Auswertung des mit den Serumproben von vier Tieren (zwei Läufer und zwei Nichtläufer) durchgeführten Zytokin-Arrays zeigte, sowohl für Leptin als auch für CCL6/C10 in der Gruppe der Nichtläufer eine höhere relative Signalstärke als zur untersuchten Gruppe der Läufer. Auch bei der Untersuchung des Fettgewebes fand sich für Leptin diese Tendenz, sodass hier von einer anti-inflammatorischen Wirkung des durchgeführten Trainingsexperimentes ausgegangen werden kann (Übersicht bei Benatti et al., 2007). Noch deutlicher fand sich die höhere relative Signalstärke für die Gruppe der Nichtläufer bei CCL6/C10. CCL6 wird im Zuge einer Entzündung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet. Die niedrigere relative Signalstärke innerhalb der Gruppe der Läufer, deutet auch hier auf einen Effekt des durchgeführten Trainingsexperimentes hin; so dass auch hier von einem anti-inflammatorischen Effekt des Trainings ausgegangen werden kann.

Die gewonnenen Daten weisen generell auf eine anti-inflammatorische Wirkung des Trainings hin (Übersicht bei Pinto et al., 2012). Da hier jedoch nur vier Mäuse (je zwei Läufer und zwei Nichtläufer) untersucht wurden, kann der Array lediglich einen Hinweis auf mögliche Trainingseffekte und –anpassungsreaktionen liefern und es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese Ergebnisse abzusichern.

5.12. Analyse von Histonmethylierungsmustern

Um zu untersuchen, welche Auswirkung das durchgeführte Laufbandtraining auf das H3K4-Methylierungsmuster der Muskulatur der murinen Hinterextremität besitzt, wurden von allen acht untersuchten Mäusen die Histone des rechten *M. gastrocnemius* isoliert und mittels *Western Blot* untersucht. Zur Etablierung und um zusätzlich Basisdaten zu Histonmethylierungsmustern in verschiedenen Muskeln der murinen Hinterextremität zu erhalten, wurden zudem in einem Vorexperiment ausgewählte Muskeln der rechten Hinterextremität von fünf weiteren, unabhängigen Mäusen auf ihr Methylierungsmuster hin untersucht. Neben der Untersuchung der H3K4-Mono- und Dimethylierung wurden in den untersuchten Geweben als Ladekontrollen

zudem Gesamt-H3 und α -Tubulin bestimmt, um den Gehalt an H3K4me1 und H3K4me2 zu quantifizieren. Zusätzlich wurde für jeden *Blot* noch eine MemCode-Färbung angefertigt. Geplant war auch die Untersuchung der H3K4-Trimethylierung, welche im Vorexperiment an C2C12-Zellen ebenfalls getestet worden war. Der hier verwendete Antikörper, sowie zwei weitere Antikörper, die zum Test kamen, zeigten zwar bei humanen Zelllinien (HeLA, RMZ) ein spezifisches Bandenmuster, jedoch nicht bei den untersuchten Proteinlysaten aus murinem Muskelgewebe. Daher war eine Untersuchung der H3K4-spezifischen Trimethylierung in den murinen Muskeln nicht möglich.

Zur Quantifizierung der Signale (Ladekontrolle und Normierung) wurden sowohl gegen H3 gesamt als auch gegen α -Tubulin gerichtete Antikörper verwendet. Dies wurde nötig, da sowohl für die Mono- und Dimethylierung und das zugehörige H3 gesamt getrennte *Blots* verwendet wurden, da sich die H3 gesamt-Bande auf derselben Höhe (13-15kDa) befand wie die Bande für mono- bzw. dimethyliertes H3. Um evtl. Interferenzen der auf die Membran transferierten Proteinlysate, welche trotz gründlichen Waschens der Membran bestehen könnten, zu verhindern, wurde die Entscheidung getroffen, je eine separate Membran für den Nachweis von H3 gesamt zu nutzen. Auf jeder untersuchten Membran wurde daher zudem auch α -Tubulin nachgewiesen, so dass eine Normierung der Signalstärke sowohl direkt auf α -Tubulin als auch indirekt auf H3 gesamt prinzipiell ermöglicht wurde.

Zusätzlich wurde für jede Membran eine Memcode-Färbung durchgeführt, um den Gesamtproteingehalt der verwendeten Membranen und die Qualität der geladenen Lysate zu überprüfen. Die Memcode-Methode eignet sich ebenfalls zur Quantifizierung, diese Möglichkeit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht genutzt, da bereits eine doppelte densitometrische Quantifizierung sowohl mit α -Tubulin als auch mit H3 gesamt erfolgt war. Bei der Untersuchung der Testmäuse zeigte sich sowohl für die Mono- als auch für die Dimethylierung eine sehr heterogene Verteilung für die einzelnen Muskeltypen der Hinterextremität. Auffallend war der *M. quadriceps*, der eine deutlich höhere relative Signalstärke bei der Untersuchung der Dimethylierung im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Muskeltypen der Hinterextremität aufwies.

Auch bei der Untersuchung des *M. gastrocnemius* der Mäuse des Trainingsexperimentes fand sich bei der Untersuchung der Dimethylierung eine niedrigere relative Signalstärke innerhalb der Gruppe der Läufer im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer, sodass hier von einer Anpassung des Methylierungsmusters als Folge des Ausdauertrainings ausgegangen werden kann. Dass Training einen Einfluss auf das Histon-Methylierungsmuster der Muskulatur hat, konnten u.a. Lindholm et al. (2014, 2016) bereits nachweisen: Die Autoren konnten u.a. zeigen, dass

beim Menschen ein dreimonatiges einbeiniges Ausdauertraining zu Veränderung des Methylierungsmusters von spezifischen Genen, welche v.a. für die Myogenese, Muskelstruktur und Muskelbioenergie kodieren, führen kann.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte für H3K4me3 zudem gezeigt werden, dass ein einmalig durchgeführtes Training zu einer 2- bis 4-fachen Erhöhung der Konzentration dieser Modifikation im *M. quadriceps* führt (Lochmann et al., 2015), eine einmalig durchgeführte Kraftbelastung jedoch zu einer Verminderung der H3K4me3-Konzentration (Willkom et al., 2017). Pandorf et al. (2009) zeigten weiterhin bei Ratten einen Zusammenhang zwischen den vornehmlich aktivierend auf die Genexpression wirkenden H3K4me3-Modifikationen und der belastungsabhängigen Regulation der Expression fasertypspezifischer MHC Gene. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für die Mono- und Dimethylierung der untersuchten Muskeltypen ein relativ einheitliches Bild, interessant erscheint der deutlich höhere H3K4-Dimethylierungsgrad im *M. quadriceps*. Bei den Mäusen der Trainingsgruppe konnte zudem für die Gruppe der Läufer für den *M.gastrocnemius* eine im Vergleich zur Gruppe der Nichtläufer höhere relative Konzentration der H3K4me1-Modifikation und eine niedrigere für H3K4me2 festgestellt werden. Unseres Wissens stellt die vorliegende Arbeit die erste Untersuchung der H3K4me1- und H3K4me2-Modifikation im murinen Muskelgewebe dar, sodass weitere Untersuchungen, insbesondere auch der übrigen Muskulatur der Hinterextremität, sowie genspezifische Histonmethylierungsanalysen nötig sind, um sowohl das physiologische Methylierungsmuster der murinen Muskulatur zu kennen als auch, um Anpassungsreaktionen der Muskulatur an Training genauer zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Skelettmuskelgewebe besitzt eine hohe Plastizität und reagiert mit einer Vielfalt von Anpassungsreaktionen auf körperliches Training. Eine möglichst genaue Kenntnis der zugrunde liegenden Mechanismen ist wichtig, um trainingsbasierte Therapiekonzepte, die bei vielen Krankheiten (wie z.B. Diabetes, Adipositas, COPD) eine Rolle spielen, neu zu entwickeln bzw. zu verbessern.

In jüngster Zeit mehren sich die Hinweise darauf, dass insbesondere epigenetische Mechanismen an der Steuerung der Trainingsanpassung beteiligt sind. Dabei sind vor allem DNA-Methylierungen, Regulation der Genexpression über micro-RNAs und Histonmodifikationen, in erster Linie differentielle Histonazetylierungen und –methylierungen, zu nennen.

Insbesondere gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass die Mono- bis Trimethylierung des Histons 3 an Lysin 4 (H3K4me1-3) eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Skelettmuskel-Genexpression in Antwort auf körperliches Training spielen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im murinen Modellsystem anhand eines Laufbandtrainings das physiologische Anpassungsmuster der Mäuse an dieses Training charakterisiert, mit spezifischem Fokus auf mögliche Veränderungen des Histon-Methylierungsmuster in der Skelettmuskulatur (*M.gastrocnemius*). Hierfür wurden acht Mäuse der Linie C57BL6N in zwei Gruppen zu je vier Mäusen unterteilt, wobei die eine Gruppe (Läufer) ein zehnwöchiges Laufbandtraining absolvierte und die andere Gruppe (Nichtläufer) als Kontrollgruppe diente.

Um den Einfluss des Trainings auf physiologische Parameter zu bestimmen, wurden beide Gruppen vergleichend hinsichtlich des Skelettsystems, des Fettgewebes, des Herz-Kreislaufsystems, des Blutes und der Skelettmuskulatur untersucht. Insbesondere das Skelettsystem und das Blut betreffend wiesen die beiden untersuchten Gruppen Unterschiede auf. Bei der Untersuchung der Tibia zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Bereich der BP (größte Breite proximal) und der KD50% (kleinste Breite Diaphyse). Die BP war in der Gruppe der Läufer signifikant erniedrigt, was vermutlich durch die eher trabekuläre Knochenstruktur der proximalen Epiphyse und deren Anpassung an die durch das Laufbandtraining mit Steigung hervorgerufenen axialen Kompressionskräfte zu erklären ist. Die KD50% war dagegen in der Gruppe der Läufer signifikant erhöht, was vermutlich auf eine Erhöhung der Knochendicke insbesondere im Bereich der Kortikalis zurückzuführen ist. Weitere Untersuchungen, insbesondere die Knochengometrie betreffend, sind hier nötig um mögliche Veränderungen im Bereich der Kortikalis, der Diaphyse und auch der periostalen Expansion im proximalen und distalen Bereich zu verifizieren.

Bei der Untersuchung der einzelnen Blutparameter zeigte sich ein deutlich signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) bei den weißen Blutkörperchen (WBC); diese waren bei den Läufern signifikant erniedrigt. Weiße Blutkörperchen stellen einen Bestandteil des Immunsystems dar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das durchgeführte Laufbandtraining zu einer Suppression von Entzündungsreaktionen führte, welche sich auch in der Auswertung des durchgeführten Zytokin-Arrays zeigte. Das durchgeführte Training hatte somit eine anti-inflammatorische Wirkung, was bereits in vorhergegangenen Studien gezeigt werden konnte.

Im Anschluss an das Laufbandtraining wurde der *M.gastrocnemius* auf Veränderungen des Histon-Methylierungsmusters (H3K4-Mono-, Di-, und Trimethylierung) hin untersucht. Zusätzlich wurde die Skelettmuskulatur der Hinterextremität von fünf weiteren, nicht in die Trainingsstudie eingeschlossenen „Testmäusen“ auf ihr Histon-Methylierungsmuster analysiert, um vergleichende Basiswerte zu erhalten. Bei der Untersuchung dieser Testmäuse zeigte sich, dass insbesondere der *M.quadriceps* eine deutlich höhere relative Signalstärke bei der H3K4-Dimethylierung zeigte als der Rest der untersuchten Muskulatur der Hinterextremität. Um ein genaueres Bild der physiologischen Histon-Methylierungsmuster der Skelettmuskulatur zu erhalten, sind jedoch weitere Analysen einer größeren Anzahl an Mäusen erforderlich, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Bei der Untersuchung der Histon-Methylierungsmuster der Mäuse aus dem Trainingsmodell zeigte sich für den *M.gastrocnemius* für die Gruppe der Läufer eine im Vergleich zu den Nichtläufern niedrigere relative Signalstärke für die H3K4-Dimethylierung, so dass hier von einer Anpassung an das durchgeführte Training ausgegangen werden kann. Auch hier sind jedoch weitere Untersuchungen mit einer größeren Individuenanzahl nötig, um die Anpassungen des Methylierungsmusters an körperliches Training zu untersuchen. Die Untersuchung der H3K4-Trimethylierung an murinem Muskelgewebe konnte in der vorliegenden Arbeit leider nicht erfolgen, da die Antikörper zwar in einem Vorversuch an murinen C2C12 Zellen und humanen HeLA und RMZ Zellen getestet wurden, jedoch beim murinen Muskelgewebe kein spezifisches Bandenmuster zeigten, so dass auch hier weitere Untersuchungen nötig sind.

Aus den Resultaten dieser Arbeit könnten sich interessante therapeutische Implikationen ergeben, z.B. in Zusammenhang mit einer pharmakologischen Beeinflussung von Histonmethylierungsmustern.

7. Summary

Training adaptation and epigenetic modifications in skeletal muscle

Skeletal muscle tissue has a high plasticity and reacts with a variety of adaptive responses to physical training. Understanding the underlying mechanisms is important to develop, improve and refine training-based therapy concepts that play a role in many diseases (such as diabetes, obesity, COPD).

There is increasing evidence that epigenetic mechanisms in particular are involved in controlling exercise adaptation. Specifically, DNA methylation, regulation of gene expression via microRNAs, and histone modifications, primarily differential histone acetylations and methylations might be important.

In particular, there is much evidence that mono- to trimethylation of histone 3 on lysine 4 (H3K4me1-3) could play a crucial role in the regulation of skeletal muscle gene expression in response to exercise.

Within the scope of this work, a mouse model was used to characterize the physiological adaptation pattern to training, with a specific focus on possible changes of the histone methylation pattern in skeletal muscle (*m.gastrocnemius*) tissue. For this purpose, eight mice of the C57BL6N line were divided into two groups of four mice, with one group (runners) performing a treadmill training for ten weeks and the other group (non-runners) as a “sedentary” control group.

In order to determine the influence of the training on physiological parameters, both groups were examined with regard to the skeletal system, adipose tissue, cardiovascular system, blood and skeletal muscle. In particular, the skeletal system and blood showed significant differences between the two groups studied. Examination of the tibia revealed significant differences ($p < 0.05$) in BP (largest width proximal) and KD50% (smallest width diaphysis). BP was significantly decreased in the runners group, presumably due to the more trabecular structure in the proximal epiphysis and adaptation to the axial compressive forces caused by treadmill training. By contrast the KD50% was significantly increased in the group of runners, which is probably due to an increase in thickness, especially in the cortical area. Further investigations, especially concerning the geometry of the bone, are necessary to verify possible changes in the cortical area of the diaphysis as well as the periosteal expansion in the proximal and distal area. Examination of the individual blood parameters revealed a significant difference ($p < 0.001$) in white blood cells (WBC); these were significantly reduced in the runners. White blood cells are an integral part of the immune system, so it can be assumed that the treadmill training resulted in a suppression of inflammatory reactions, which was also reflected in the evaluation of the

cytokine array. The training thus led to an anti-inflammatory effect, which could already be shown in previous studies.

Following treadmill training, the *m.gastrocnemius* was examined for changes in the histone methylation pattern (H3K4 mono-, di-, and trimethylation). In addition, the hindlimb skeletal muscle of five other “test mice” (not included in training study) was examined for its histone methylation pattern to obtain basal data. Examination of these mice revealed that *m.quadriceps* in particular showed a significantly higher relative degree of H3K4 dimethylation than the rest of the examined hindlimb muscles. However to obtain a more accurate picture of the physiological methylation patterns of skeletal muscle, further analyzes of a larger number of mice are required to obtain statistically significant results on histone methylation patterns.

When investigating the methylation patterns of the mice from the training model, we found that the *m.gastrocnemius* showed a lower relative degree of the dimethylation for the group of runners when compared to the control group, so that an adaptation to the training can be assumed. Nevertheless, again, further investigations with a larger number of individuals are necessary to investigate the adaptations of the methylation pattern to physical training.

Unfortunately, H3K4 trimethylation on murine muscle tissue could not be analyzed, because even though the antibodies had been tested in a preliminary test on murine C2C12 cells and human HeLA and RMZ cells, we could not detect a specific signal in murine muscle tissue.

From the results of this work, interesting therapeutic implications could arise, e.g. with regard to pharmacological interventions aiming at modifying histone methylation patterns.

8. Literaturverzeichnis

Augusto V, Padovani CR, Eduardo G, Campos R. (2004). Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz. J. Morphol. Sci.* **21(2)**, 89-94.

Astorino TA, Allen RP, Roberson DW, Jurancich M. (2012). Effect of high-intensity interval training on cardiovascular function, VO₂MAX, and muscular force. *J. Strength and Conditioning Research* Jan **26(1)**, 138-145.

Barreiro E, Sznajder JI. (2013). Epigenetic regulation of muscle phenotype and adaptation: a potential role in COPD muscle dysfunction. *J. Appl. Physiol.* **114(9)**, 1263-1272.

Benatti FB, Lancha AH Jr. (2007). Leptin and endurance exercise: implications of adiposity and insulin. *Rev. Bras. Med. Esporte* **13(4)**, 239-244.

Barski A, Cudappah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129(4)**, 823-837.

Berkholz J, Orgeur M, Stricker S, Munz B. (2015). SkNAC and Smyd1 in transcriptional control. *Experimental Cell Research* **336**, 182-191.

Birchard SJ, Sherding RG (Hrsg.). (2006). *Saunders Manual of Small Animal Practice*. Elsevier Inc. S.750ff.

Bloch W, Zimmer P. (2012). Epigenetik und Sport. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **63(6)**, 163-167.

Böhm M. (2000). *Herzinsuffizienz*. Georg Thieme Verlag KG MVS Medizinverlage 1.

Brown EM, Hurwitz S, Aurbach GD. (1977). Beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP content and parathyroid hormone release from isolated bovine parathyroid cells. *Endocrinology* **107**, 1998-2003.

Brummer H, Zhang MY, Piddoubny M, Medler S. (2013). Hybrid fibers transformation into distinct fiber types in maturing mouse muscles. *Cells Tissues Organs* **198**, 227-236.

Burt JE, Barber GM. (1996). *Elementary statistics for geographers*. 2. Ausgabe 383-412. New York (the Guilford Press).

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**, 637-706.

Danson EJJ, Paterson DJ. (2003). Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercise-trained mice. *J. Physiol.* **546.1**, 225-232.

DeAngelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM, Iriqoyen MC. (2004). Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J. Appl. Physiol.* **96(6)**, 2174-2178.

Di Masso RJ, Silva PS, Font MT. (2004). Muscle-bone relationships in mice selected for different body conformations. *J. Musculoskel Neuron Interact* **4(1)**, 41-47.

Driesch A. (1976). *A guide to measurement of animal bones from archaeological sites*. Peabody Museum of Archaeology and Ethnology. Harvard University.

Ecker K. (2016). Blut, Herz&Kreislauf. **BoD** S.86.

Egan B, Zierath JR. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism* **17**, 162-184.

Ehlert T, Simon P, Moser DA. (2013). Epigenetics in sports. *Sports Med.* **43 (2)**, 93-110.

Eissenberg JC, Shilatifard A. (2010). Histone H3 Lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev. Biol.* **339(2)**, 240-249.

Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. (2003). Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36(12)**, 1751-1759.

Fekete E, Green GV. (1933). Differential growth in the mouse. *J. Exper. Zoology*, **Vol.66**, 351-370.

Fischer CP. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training; what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* **12**, 6-33.

Flynn MG, McFarlin BK, Markofski MM. (2017). The anti-inflammatory actions of exercise training. *Am. J. Lifestyle Med.* **1(3)**, 220-235.

Friedmann B. (2000). Entwicklungen im Höhenttraining: Trends und Fragen. *Deutsche Zeitung für Sportmedizin.* **51(12)**, 418-423.

Friedmann B. (2007). Neuere Entwicklungen im Krafttraining. Muskuläre Anpassungsreaktionen bei verschiedenen Krafttrainingsmethoden. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin.* **58(1)**, 12-18.

Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. (2013). Stress hyperlactataemia: present understanding and controversy. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2(4)**, 339-347.

Giannaki CD, Aphasimis G, Sakkis P, Hadjicharalambous M. (2016). Eight weeks of a combination of high intensity interval training and conventional training reduce visceral adiposity and improve physical fitness: a group-based intervention. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* **56(4)**, 483-490.

Gibb AA, McNally LA, Riggs DW, Conklin DJ, Bhatnagar A, Hill BG. (2016). FVB/NJ Mice are a useful model for examining cardiac adaptations to Treadmill exercise. *Front. Physiol.* **7**, 636.

Gielen S, Adams V, Möbius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, Kempf W, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R. (2003). Anti-inflammatory effect of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J. American College of Cardiology* **42(5)**, 861-868.

Gorza L. (1990). Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosine ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochemistry and Cytochemistry* **38(2)**, 257-265.

Güllich A, Krüger M. (2013). Sport. Springer Link.

Holloszy JO, Booth FW. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **38**, 273-291.

Hong S, Zhou W, Fang B, Lu W, Loro E, Damle M, Ding G, Jager J, Zhang S, Zhang Y, Feng D, Chu Q, Dill BD, Molina H, Khurana TS, Rabinowitz JD, Lazar MA, Sun Z. (2017). Dissociation of muscle insulin sensitivity from exercise endurance in mice by HDAC3 depletion. *Nat. Med.* **23(2)**, 223-234.

Hooper ACB. (1977). Bone length and muscle weight in mice subjected to genetic selection for the relative length of the tibia and radius. *Life Science Vol.* **22(3)**, 283-286.

Hoppeler H. (2016). Molecular networks in skeletal muscle plasticity. *J. Experim. Biol.* **219**, 205-213.

Ing VW. (1984). The etiology and management of leukopenia. *Can. Fam. Physician* **30**, 1835-1839.

Izard RM, Fraser WD, Negus C, Sale C, Greeves JP. (2016). Increased density and periosteal expansion of the tibia in young adult men following short-term arduous training. *Bone* **88**, 13-19.

Jack RS. (2000). CD14 in the Inflammatory Response.

Jacobs I. (1986). Blood lactate. Implications for training and sports performance. *Sports Med.* **3(1)**, 10-25.

Jungermann K, Möhler H. (2013). *Biochemie: Ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, Biologie und Pharmazie.* Springer Verlag, S.338.

Junquera LCU, Carneiro J. (1984). *Histologie.* Springer Verlag.

Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A, Leinwand LA, Buttrick PM. (1994). Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am. J. Physiol.* **267(3)**, 1167-1173.

- Kawano F, Nimura K, Ishono S, Nakai N, Nakata K, Ohira Y.** (2015). Differences in histone modifications between slow- and fast-twitch muscles of adult rats and following overload, denervation, or valproic acid administration. *J. Appl. Physiol.* **119(10)**, 1042-1052.
- Kim DH, Sandoval D, Seeley RJ.** (2008). The role of GM-CSF in adipose tissue inflammation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295(5)**, 1038-1048.
- Kim KB.** (2014). Effect of different training mode on Interleukin-6 (IL-6) an C-reactive protein (CRP) in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* **18(4)**, 371-378.
- Kramer K, van Acker SABE, Voss H-P, Grimbergen JA, van der Vijgh WJF, Bast A.** (1993). Use of Telemetry to record Electrocardiogram an heart rate in freely moving Mice. *JPM Vol.* **30(4)**, 209-215.
- Lamina S, Okoye CG.** (2011). Effect of interval training program on white blood cell count in the management of hypertension: a randomized controlled study. *Niger. Med. J.* **52(4)**, 271-277.
- Lanzi S, Codecasa F, Cornacchia M, Maestrini S, Capodaglio P, Brunani A, Fanari P, Salvadori A, Malatresta D.** (2015). Short-term HIIt and FAT_{max} training increase aerobic and metabolic fitness in men with class II and III obesity. *Obesity* **23(10)**, 1987-1994.
- Lee MO, Clark E.** (1929). Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *Am. J. Physiol.* **89**, 24-33.
- Lee HJ.** (2018). Exercise training regulates angiogenic gene expression in white adipose tissue. *J. Exercise Rehabilitation* **14(1)**, 16-23.
- Lilja M, Mandic M, Aprò W, Melin M, Olsson K, Rosenberg S, Gustafsson T, Lundberg TR.** (2017). High-dose of anti-inflammatory drugs compromise muscle strength and hypertonic adaptations to resistance training in young adults. *Acta Physiol. (Oxf).* **222(2)**.
- Lindholm ME, Marabita F, Gomez-Cabrero D, Rundqvist H, Eckström TJ, Tegnèr J, Sundberg CJ.** (2014). An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the

epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. *Epigenetics* **9**, 1557-69.

Lindholm ME, Giacomello S, Solnestam BW, Fischer H, Kjellqvist S, Huss M, Sundberg CJ. (2016). Endurance training alters expression of over 3000 isoforms and 34 novel transcripts in human skeletal muscle. *PLoS Genet.* **12(9)**.

Lochman TL, Thomas RR, Bennett JP Jr, Taylor SM. (2015). Epigenetic modifications of the PGC-1 α Promotor during exercise induced expression in Mice. *PLoS One Jun 8;* **10(6)**.

Ma B, Zhu Z, Homer RJ, Gerard C, Strieter R, Elias JA. (2004). The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodelling. *J. Immunol.* **172**, 1872-1881.

Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14(1)**, 38-48.

Malafaia AB, Nassif PAN, Ribas CAPM, Ariede BL, Sue KN, Cruz MA. (2013). Obesity induction with high fat sucrose in rats. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* **26(1)**, 17-21.

McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. (2009). Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J. Physiol.* **587(Pt24)**, 5951-5958.

Meissner M, Havinqa R, Boverhof R, Kema I, Groen AK. (2010). Exercise enhances whole.body cholesterol turnover in mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42(8)**, 1460-1468.

Mohan RM, Choate JK, Golding S, Herring N, Casadei B, Paterson DJ. (2000). Peripheral pre synaptic pathway reduces the heart rate response to sympathetic Activation following exercise training: role of NO. *Cardiovascular Research* **47**, 90-98.

Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN. (2001). The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med.* **31(2)**, 115-144.

Mosley JR, Lanyon LE. (1998). Strain rate as a controlling influence on adaptive modeling in response to dynamic loading of the ulna in growing male rats. *Bone* **23(4)**, 313-318.

Oldknow KJ, Macrae VE, Farquharson C, Bünger L. (2015). Evaluating invasive and non-invasive methods to determine fat content in the laboratory mouse. *Open Life Sci.* **10**, 81-88.

Oztasan N, Timur H, Siktar E, Gumustekin K, Akar S, Dane S, Gul M. (2007). Effects on endurance training on gonadal fat pad and ventricular mass in rat. *Biology of Sport*, Vol. **24(3)**, 264-273.

Pandorf CE, Haddad F, Wright C, Bodell PW, Baldwin KM. (2009). Differential epigenetic modifications of histones at the myosin heavy chain genes in fast and slow skeletal muscle fibers and in response to muscle unloading. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297(1)**, C6-16.

Pang MY, Lau RW. (2010). The effects of treadmill exercise training on hip bone density and tibial bone geometry in stroke survivors: a pilot study. *Neurorehabil. Neural Repair* **24(4)**, 368-376.

Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Niemann DC. (2015). Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc. Immunol. Rev.* **21(8)**, 8-25.

Pette D, Staron RS. (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* **170**, 143-223.

Pette D, Staron RS. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique* **50**, 500-509.

Pettersson J, Hindorf U, Persson P, Bentsson T, Malmqvist U, Werkström V, Ekelund M. (2007). Muscular exercise can cause highly pathological liver function test in healthy men. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **65(2)**, 253-259.

Pinto A, Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Bùtta C, Milio G, Licata G. (2012). Effects of physical exercise on inflammatory markers of atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* **18(28)**, 4326-4349.

Pollard TD. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 451-477.

Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. (2007). Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J. Clin. Invest.* **117(9)**, 2459-2467.

Pralong FP, Gaillard RC. (2001). Neuroendocrinology of Leptin. *Pituitary Vol.* **4(1-2)**, 25-32.

Reed JA, Clegg DJ, Seeley RJ. (2005). GM-CSF action in the CNS decreases food intake and body weight. *J. Clinical Investigation.* **115(11)**, 3035-3044.

Rodeck B, Zimmer KP. (2008). Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. Springer Verlag, S.335.

Rogers P, Webb GP. (1980). Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br. J. Nutr.* **43**, 83-86.

Sarzynski MA, Ghosh S, Bouchard C. (2017). Genomic and transcriptomic predictors of response levels to endurance exercise training. *J. Physiol.* **595(9)**, 2931-2939.

Scholz A, Plate KH, Reiss Y. (2015). Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1347**, 45-51.

Schultz A, Mendonca LS, Aquila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. (2012). Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp. Toxicol. Pathol.* **64(4)**, 273-282.

Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. (2001). Human Skeletal muscle fiber type classifications. *Physical Therapy* **81(11)**, 1810-1816.

Silva VC, Giusti-Paiva A. (2015). Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. *Brain Behav. Immun.* **45**, 109-117.

Soffe Z, Radley-Crabb HG, McMahon C, Grounds MD, Shavlakadze T. (2015). Effects of loaded voluntary wheel exercise on performance and muscle hypertrophy in young and old male C57Bl/6J mice. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* **26(2)**, 172-188.

Somerville JM, Aspden RM, Armour KE, Armour KJ, Reid DM. (2004). Growth of C57Bl/6 mice and the material and mechanical properties of cortical bone from the tibia. *Calcif. Tissue Int.* **74**, 469-475.

Steinacker JM, Wang L, Lormes W, Reißnecker W, Liu Y. (2002). Strukturanpassungen des Skelettmuskels auf Training. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **53(12)**, 354-360.

Suominen TH, Korhonen MT, Alèn M, Mero A, Törmäkangas T, Souminen H. (2017). Effects of a 20-week high-intensity strength and sprint training program on tibial bone structure and strength in middle-aged and older male sprint athletes: a randomized controlled trial. *Osteoporos. Int.* **28**, 2663-2673.

Talebi-Garakani E, Safarzade A. (2012). Resistance training decreases serum inflammatory markers in diabetic rats. *Endocrine* **43(3)**, 564-570.

Thalacker-Mercer A, Stec M, Cui X, Cross J, Windham S, Bamman M. (2013). Cluster analysis reveals differential transcript profiles associated with resistance training-induced human skeletal muscle hypertrophy. *Physiol. Genomics* **45(12)**, 499-507.

Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, Sweeney G, Zhang J, Tso AW, Chow WS, Wat NM, Xu JY, Hoo RL, Xu A. (2007). Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin. Chem.* **53(1)**, 34-41.

Wieser V. (2015). Lipocalin 2 drives neutrophilic inflammation in alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* **64(4)**, 872-880.

Willkomm L, Gehlert S, Jacko D, Schiffer T, Bloch W. (2017). P387 MAPK activation and H3K4 trimethylation is decreased by lactate in vitro an high intensity resistance training in human skeletal muscle. PLoS One May 3; **12(5)**.

Zelber-Sagi S, Buch A, Yeshua H, Vaisman N, Webb M, Harari G, Kis O, Fliss.Isakov N, Izhakov E, Halpern Z, Santo E, Oren R, Shibolet O. (2014). Effect of resistance training on non.alcoholic fatty-liver disease a randomized-controlled trial. World J. Gastroenterol. **20(15)**, 4382-4392.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der quergestreiften Skelettmuskulatur	S.2
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Histonoktamers	S.8
Abbildung 3: Makrolon-Käfig mit Haltung von (A) einer Maus und (B) zwei Mäusen	S.18
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Laufbandtrainings von Woche 1-10 mit einer Eingewöhnung von einer Woche	S.19
Abbildung 5: Hautschnitt (A) und Erweiterung der Schnitfführung (B) im Zuge der Präparation	S.21
Abbildung 6: Präparation der Extremitätenmuskulatur an der rechten Hinterextremität im Zuge der Präparation	S.21
Abbildung 7: Situs nach Entnahme der Muskulatur an der rechten Hinterextremität und Eröffnung des Peritoneums und Thorax	S.23
Abbildung 8: PhysioSuite Messgerät (A), Messung an der Schwanzspitze (B), Sensor (C)	S.31
Abbildung 9: <i>Grip Strength</i> . Messung der isolierten Vorderextremität (A) und der Kombination Vorder- und Hinterextremität (B)	S.31
Abbildung 10: Dargestellt ist die Messung der Parameter GL (A), BP (B), BD (C), TD (D), und KD50% (E)	S.33
Abbildung 11: Messung der GL (A) und GB (B)	S. 33
Abbildung 12: Blick auf die Ventilebene, nach Abtrennung der Atrien	S.34
Abbildung 13: Darstellung der Durchschnitts-Körpergewichte in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer zu Beginn und zum Ende des zehnwöchigen Trainingsexperimentes	S.36
Abbildung 14: Dargestellt sind die Gewichtskurven der Nichtläufer (NL) (A) und der Läufer (L) (B) während des Trainingsexperimentes	S.37
Abbildung 15: Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (MW) der Herzfrequenzmessungen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L). Die Nummern der Balken entsprechen der Nummerierung der Tiere	S.38
Abbildung 16: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Herzfrequenzmessungen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L)	S.39
Abbildung 17: Darstellung der <i>Grip Strength</i> der isolierten Vorderextremität (VE) an den 4 Untersuchungstagen mit jeweils 5 Messungen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) (A) und der Läufer (L) (B)	S.40/41
Abbildung 18: Dargestellt sind die nasoanale Länge der einzelnen Nichtläufer (NL)	

und Läufer (L) (A), sowie die Mittelwerte (MW) der nasoanalen Länge in den Gruppen der Nichtläufer und Läufer (B) _____	S.42
Abbildung 19: Mittelwerte (MW) des Lee-Indexes in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.43
Abbildung 20: Dargestellt sind die Korrelationen des Körpergewichts zum Gewicht der gonadalen Fettdepots in den Gruppen der Nichtläufer (NL) (A) und der Läufer (L) (B) _____	S.44
Abbildung 21: Dargestellt sind die Mittelwerte des Gewichts des linken gonadalen Fettdepots relativ zum Körpergewicht (KGW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.45
Abbildung 22: Darstellung der BP der rechten Tibia in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und Läufer (L) (A), sowie der Mittelwerte (MW) der BP der rechten Tibia (B) (*p<0,05)_____	S.46/47
Abbildung 23: Darstellung der KD50% der rechten Tibia in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und Läufer (L) (A), sowie der Mittelwerte (MW) der KD50% der rechten Tibia (B) (*p<0,05)_____	S.47/48
Abbildung 24: Dargestellt sind die Herzgewichte (Mittelwerte, MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.49
Abbildung 25: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des Herzgewichts (HW) in Relation zum Körpergewicht (KGW) in der Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.49
Abbildung 26: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Gewichte der Atrien (A) und der Ventrikel (B) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.50
Abbildung 27: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Gewichte des rechten Ventrikels (A) und des linken Ventrikels mit Septum (B) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.51
Abbildung 28: Dargestellt sind die größte Länge (A) und die größte Breite (B) des Herzens (Mittelwerte, MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.52/53
Abbildung 29: Dargestellt sind die Dicke der rechten Ventrikelwand (A), die Dicke der linken Ventrikelwand (B) und die Dicke des Septums (C) (Mittelwerte, MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L)_____	S.53/54
Abbildung 30: dargestellt sind die Verhältnisse Herzgewicht (HW) zu Tibialänge (TL) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) als Mittelwerte (MW)_____	S.55

Abbildung 31: Dargestellt ist der Mittelwert des Gewichts des <i>M. quadriceps</i> (A), des <i>M. gastrocnemius</i> (B) und des Zwerchfells (C) relativ zum Körpergewicht (KGW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.56/57
Abbildung 32: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des Gewichts der Leber relativ zum Körpergewicht (KGW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.58
Abbildung 33: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Alanin-Aminotransferase-Konzentration (ALT) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.59
Abbildung 34: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Cholesterolkonzentration in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.60
Abbildung 35: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Triglycerid-Konzentration in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.60
Abbildung 36: Dargestellt ist die über qPCR ermittelte relative Konzentration an Leptin mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer _____	S.61
Abbildung 37: Dargestellt sind die über qPCR ermittelten relativen Konzentrationen an Lipocalin-2-mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in der Gruppe der Nichtläufer und Läufer (A), sowie ohne Maus 110 in der Gruppe der Nichtläufer (B) _____	S.62/63
Abbildung 38: Dargestellt sind die über qPCR ermittelten relativen Konzentrationen an Angiopoietin-2-mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in den Gruppen der Nichtläufer und Läufer _____	S.64
Abbildung 39: Dargestellt sind die über qPCR ermittelten relativen Konzentrationen an GM-C-SF-mRNA (Mittelwerte) im gonadalen Fettdepot in den Gruppen der Nichtläufer und der Läufer _____	S.65
Abbildung 40: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des Hämatokrits in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.67
Abbildung 41: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Konzentration an weißen Blutkörperchen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) (***) $p < 0,001$ _____	S.68
Abbildung 42: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Blut-Laktatkonzentration in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.69
Abbildung 43: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Blutcalciumkonzentrationen in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.70
Abbildung 44: Dargestellt sind die mittlere Glucosekonzentration (MW) in den Gruppen der Nichtläufer (NL) und der Läufer (L) _____	S.71

Abbildung 45: zu sehen sind die belichteten Röntgenfilme des Zytokin-Arrays der vier untersuchten Mäuse. Negativ- und Positivkontrollen sowie zwei Faktoren, deren Konzentration beim Vergleich zwischen beiden Zweiergruppen deutlich unterschiedlich war, sind farbig markiert (siehe Legende rechts oben)	S.72
Abbildung 46: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für Angiopoietin-2 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer)	S.73
Abbildung 47: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für Leptin ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer)	S.73
Abbildung 48: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für Lipocalin-2 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer)	S.74
Abbildung 49: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für CD14 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer)	S.75
Abbildung 50: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für CCL6 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer)	S.75
Abbildung 51: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für GM-CSF ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer)	S.76
Abbildung 52: Auswertung des Zytokin-Arrays. Dargestellt ist die für IL-6 ermittelte relative Signalstärke für die Mäuse 111 und 112 (Läufer) und 115 und 116 (Nichtläufer)	S.77
Abbildung 53: Dargestellt sind C2C12-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses. A: Tag 0, B: Tag 1, C: Tag3, D: Tag4, E: Tag 5	S.78
Abbildung 54: Gezeigt sind H3K4-Methylierungen in differenzierenden C2C12-Zellen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer <i>Western Blot</i> . Er zeigt spezifische Signale für H3K4-Monomethylierung (H3K4me1, A), H3K4-Dimethylierung (H3K4me2, B), H3K4-Trimethylierung (H3K4me3, C) und H3 gesamt (A-C). Jeder <i>Blot</i> wurde zunächst mit einem H3K4me1/2/3 spezifischen AK (aus Kaninchen) und dann nach Abklingen des Signals und	

Waschen mit einem gegen H3 gesamt gerichteten AK (aus Maus) inkubiert. Für jede Methylierungsform, bzw. –stufe wurde ein eigener *Blot* angefertigt. _____ S.79

Abbildung 55: Dargestellt ist das H3K4-spezifische Monomethylierungsmuster in verschiedenen Muskeltypen der fünf Testmäuse. A) Zeigt repräsentativ die angefertigten *Western Blots* von TM2. Diese zeigen spezifische Signale für die H3K4-Monomethylierung (H3K3me1), α -Tubulin und H3 gesamt. Zusätzlich ist ein Ausschnitt der Memcode-Färbung gezeigt. B) Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf H3-gesamt ____ S.80/81

Abbildung 56: Dargestellt ist das H3K4-spezifische Monomethylierungsmuster in verschiedenen Muskeltypen der fünf Testmäuse. A) Zeigt repräsentativ die angefertigten *Western Blots* von TM3. Diese zeigen spezifische Signale für die H3K4-Dimethylierung (H3K3me2), α -Tubulin und H3 gesamt. Zusätzlich ist ein Ausschnitt der Memcode-Färbung gezeigt. B) Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf H3-gesamt _____ S.81/82

Abbildung 57: Dargestellt ist die Analyse der H3K4-spezifische Monomethylierungsmuster im *M.gastrocnemius* der Mäuse der Trainingsstudie A) Original*blots* für H3K4me1, H3 gesamt sowie α -Tubulin und MemCode-Färbung. B) Quantifizierung des H3K4-spezifischen Monomethylierungsmusters. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf H3-gesamt. C) zeigt das H3K4-spezifische Monomethylierungsmuster des *M.gastrocnemius* in der Gruppe der Nichtläufer (Normiert auf 1) und der Gruppe der Läufer. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Monomethylierung normiert auf H3-gesamt. _____ S.83/84

Abbildung 58: Dargestellt ist die Analyse der H3K4-spezifische Dimethylierungsmuster

im *M.gastrocnemius* der Mäuse der Trainingsstudie A) Originalblots für H3K4me2, H3 gesamt sowie α -Tubulin und MemCode-Färbung. B) Quantifizierung des H3K4-spezifischen Dimethylierungsmusters. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf H3-gesamt. C) zeigt das H3K4-spezifische Dimethylierungsmuster des *M.gastrocnemius* in der Gruppe der Nichtläufer (Normiert auf 1) und der Gruppe der Läufer. Die hellblauen Säulen zeigen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf α -Tubulin, die dunkelblauen Säulen die densitometrische Quantifizierung der H3K4-spezifischen Dimethylierung normiert auf H3-gesamt. _____ S.85/86

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Metabolische, kontraktile und morphologische Charakteristika der einzelnen Fasertypen des Skelettmuskels _____	S.4
Tabelle 2: Muskelfasertypen in der C57BL6/J-Maus _____	S.4
Tabelle 3: Aufgelistet sind Geschwindigkeit, Steigung und Zeitdauer des Laufbandtrainings in der Eingewöhnungswoche _____	S.19
Tabelle 4: Aufgelistet sind Geschwindigkeit, Steigung und Zeitdauer des Laufbandtrainings während der ersten fünf Wochen _____	S.20
Tabelle 5: Dargestellt sind die einzelnen Messergebnisse (M1-M5) für die Herzfrequenz, sowie die jeweiligen Mittelwerte _____	S.38
Tabelle 6: <i>Grip Strength</i> -Messung der Vorderextremität _____	S.39
Tabelle 7: <i>Grip Strength</i> -Messung der Vorder- und Hinterextremität kombiniert _____	S.40
Tabelle 8: Dargestellt sind das Gewicht des linken gonadalen Fettdepots und das Gesamtgewicht der untersuchten Mäuse in Gramm _____	S.45
Tabelle 9: Aufgelistet sind die gemessenen Gewichte der verschiedenen Herzteile der einzelnen Mäuse, Angaben in mg _____	S.52
Tabelle 10: Aufgelistet sind die Gewichte der präparierten Muskeln relativ zum Körpergewicht _____	S.55/56
Tabelle 11: Aufgelistet sind die Gewichte der Leber relativ zum Körpergewicht (KGW) der untersuchten Mäuse _____	S.57
Tabelle 12: Dargestellt sind die mit der Leber assoziierten Blutparameter der untersuchten Mäuse. In Rot sind die von der Referenz nach oben abweichenden Parameter in Blau die von der Referenz nach unten abweichenden Parameter markiert _____	S.58
Tabelle 13: Dargestellt sind die hämatologischen Parameter der untersuchten Mäuse. Rot sind die von der Referenz nach oben abweichenden Parameter, blau die von der Referenz nach unten abweichenden Parameter markiert _____	S.65/66
Tabelle 14: Dargestellt sind verschiedene blutchemische Parameter der untersuchten Mäuse. Rot sind die von der Referenz nach oben abweichenden Parameter, blau die von der Referenz nach unten abweichenden Parameter markiert. Die leberspezifischen Parameter sind in entsprechenden Kapitel (Tab.12) zusammengefasst. _____	S.68/69
Tabelle 15: Aufgeführt die nasoanale Länge bezogen auf das Alter der in den verschiedenen Studien untersuchten Mäuse. NL = Nichtläufer, L = Läufer _____	S.90

Tabelle 16: Aufgeführt die GL der Tibia bezogen auf das Alter der in den verschiedenen Studien untersuchten Mäuse. NL = Nichtläufer, L = Läufer _____ S.92

11. Anhang

Adiponectin
Amphiregulin
Angiopoietin 1
Angiopoietin 2
Angiopoietin-like 3
BAFF/BLyS/TNFSF13B (B-cell activating factor/B lymphocyte stimulator/tumor necrosis factor ligand superfamily 13b)
C1qR1/CD93 (Complement component C1q/Cluster of Differentiation 93)
CCL2/JE/MCP-1 (CC-chemokine ligand 2/Monocyte chemoattractant protein 1)
CCL3/CCL4/MIP-1a/b (CC-chemokine ligand 3/ CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein 1a/b)
CCL5/RANTES (CC-chemokine ligand 5/ regulated and normal T cell expressed and secreted)
CCL6/C10 (CC-chemokine ligand 6)
CCL11/Eotaxin (CC-chemokine ligand 11)
CCL12/MCP-5 (CC-chemokine ligand 12/Monocyte chemoattractant protein 5)
CCL17/TARC (CC-chemokine ligand 17/thymusaktivitätsregulierendes Chemokin)
CCL19/MIP-3b (CC-chemokine ligand 19/macrophage inflammatory protein 3b)
CCL20/MIP-3a (CC-chemokine ligand 20/macrophage inflammatory protein 3a)
CCL21/6CKine (CC-chemokine ligand 21/6)
CCL22/MDC (CC-chemokine ligand 22)
CD 14 (Cluster of Differentiation 14)
CD40/TNFRSF5 (Cluster of differentiation 40/tumor necrosis factor receptor superfamily 5)
CD160 (Cluster of Differentiation 160)
Chemerin
Chitinase-3-like 1
Coagulation Factor III/Tissue Factor
Complement Component C5/C5a
Complement Factor D
C-Reactive Protein/CRP
CX3CL1/Fractalkine
CXCL1/KC (Chemokine C-X-C-motif Ligand 1)
CXCL2/MIP-2 (Chemokine C-X-C-motif Ligand 2/ macrophage inflammatory protein 2)
CXCL9/MIG (Chemokine C-X-C-motif Ligand 9/monokine induced by gamma-interferon)
CXCL10/IP-10 (Chemokine C-X-C-motif Ligand 10/interferon gamma-induced protein 10)
CXCL11/I-TAC (Chemokine C-X-C-motif Ligand 11/interferon inducible T-cell alpha chemoattractant)

CXCL13/BLC/BCA-1 (Chemokine C-X-C-motif Ligand 13/b lymphocyte chemoattractant/b-cell attracting chemokine 1)
CXCL16 (Chemokine C-X-C-motif Ligand 16)
Cystatin C
DKK-1 (dickkopf-related protein 1)
DPPIV/CD26 (Dipeptidyl-peptidase-4)
EGF (epidermal growth factor)
Endoglin/CD 105 (Cluster of Differentiation 105)
Endostatin
Fetuin A/AHSG (alpha-2-hs-glykoprotein)
FGF acidic (fibroblast growth factor acidic)
FGF-21(fibroblast growth factor 21)
Flt-3 Ligand (fms related tyrosine kinase 3 Ligand)
Gas-6 (growth arrest specific 6)
G-CSF (granulocte colony stimulating factor)
GDF-15 (growth/differentiation factor 15)
GM-CSF (granulocyte macrophage colony .stimulating factor)
HGF (hepatocyte growth factor)
ICAM-1/CD 54 (intercellular adhesion molecule 1/Cluster of Differentiation 54)
IFN-y (Interferon gamma)
IGFBP-1 (Insulin-like growth factor binding protein 1)
IGFBP-2 (Insulin-like growth factor binding protein 2)
IGFBP-3 (Insulin-like growth factor binding protein 3)
IGFBP-5 (Insulin-like growth factor binding protein 5)
IGFBP-6 (Insulin-like growth factor binding protein 6)
IL-1a/IL-1F1 (Interleukin 1a)
IL-1b/IL-1F2 (Interleukin 1b)
IL-1ra/IL-1F3 (Interleukin 1ra)
IL-2 (Interleukin 2)
IL-3 (Interleukin 3)
IL-4 (Interleukin 4)
IL-5 (Interleukin 5)
IL-6 (Interleukin 6)
IL-10 (Interleukin 10)
IL-11 (Interleukin 11)
IL-12 p40 (Interleukin 12)

IL-13 (Interleukin 13)
IL-15 (Interleukin 15)
IL-17A (Interleukin 17A)
IL-22 (Interleukin 22)
IL-23 (Interleukin 23)
IL-27 p28 (Interleukin 27)
IL-28A/B (Interleukin 28A)
IL-33 (Interleukin 33)
LDL R (low density lipoprotein receptor)
Leptin
LIF (Leukämiehemmender Faktor)
Lipocalin-2/NGAL (neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin)
LIX (Lipopolysaccharid-induced chemokine)
M-CSF (macrophage colony-stimulating factor)
MMP-2 (matrix-metalloprotease 2)
MMP-3 (matrix-metalloprotease 3)
MMP-9 (matrix-metalloprotease 9)
Myeloperoxidase
Osteopontin (OPN)
Osteoprotegrin/TNFRSF11B (umor necrosis factor receptor superfamily 11B)
PD-ECGF/Thymidine phosphorylase (Platelet dreived endothelial cell growth factor)
PDGF-BB (platelet derived growth factor BB)
Pentraxin 2/SAP
Pentraxin 3/TSG-14
Periostin/OSF-2
Pref-1/DLK-1/FA1 (preadipocyte factor 1/delta-like 1 homolog)
Proliferin
Proprotein Convertase 9/PCSK9
RAGE (Receptor for advanced glycation end products)
RBP4 (retinol binding protein 4)
Reg3G (regenerating islet.derived protein 3 gamma)
Resistin
E-Selectin/CD62E
P-Selectin/CD62P
Serpin E1/PAI-1
Serpin F1/PEDF

Thrombopoietin
TIM-1/KIM-1/HAVCR (T-cell immunoglobulin and mucin domain 1/Kidney injury molecule 1/ Hepatitis A Virus cellular receptor 1)
TNF-a (tumor necrosis factor alpha)
VCAM-1/CD106 (vascular cell adhesion protein 1/Center of Differentiation 106=
VEGF (vascular endothelial growth factor)
WISP-1/CCN4 (WNT1-inducible-signaling pathway protein 1)

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden bereits teilweise in folgender Publikation veröffentlicht:

Poster und Abstract:

Deutscher Olympischer Sportärztekongress, Hamburg, Deutschland, 24.-26.05. 2018, Poster und Abstract: Auswirkung von Laufbandtraining auf die Osteometrie der Tibia von C57BL6/N Mäusen. Lehrer, C., Schmitt A., Nieß A., Munz B.

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Barbara Munz, Frau Dr. Angelika Schmitt und dem Fachbereich der Sportmedizin des Universitätsklinikum Tübingens.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Sandra Jeske.

Danke für die zahlreiche Unterstützung und Hilfe.

Und ein ganz besonderer Dank an Matthäus Schneider.

Alle Wahrheiten sind einfach zu verstehen, sobald sie entdeckt wurden; die Schwierigkeit ist, sie zu entdecken.

Galileo Galilei

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 12.12.2019

Christin-Isabell Lehrer



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-034-9