

Aus dem Institut für Sportmedizin
des Medizinischen Universitätsklinikums Tübingen

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

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Trainingsanpassung des Skelettmuskels

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

vorgelegt von
Anne Lena Haug
Tierärztin aus Freudenstadt

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3970

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

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

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der
Trainingsanpassung des Skelettmuskels**

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

**vorgelegt von
Anne Lena Haug
Tierärztin
aus Freudenstadt**

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3970

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Barbara Munz
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Heidrun Gehlen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice; animal models; cell culture; skeletal muscle; exercise; running;
nf-kappa b (MeSH); tnfrsf25 (MeSH); tnf receptor-associated factor 6 (MeSH); SDS-Page;
polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 21.11.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-880-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

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 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

***„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.
Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.
Wer nichts prüft, entdeckt nichts.
Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“***

(Pierre Teilhard de Chardin, 1881-1955, Theologe, Geologe,
Anthropologe, Paläontologe, Philosoph)

Für meine Eltern und Nino

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aufbau und Plastizität der Skelettmuskulatur	1
1.1.1 Muskelfasertypen.....	2
1.1.2 Trainingsbedingte Anpassungsreaktionen des Skelettmuskels	4
1.1.2.1 Metabolische Veränderungen.....	5
1.1.2.2 Auf-, Ab- und Umbauprozesse im Sarkomer.....	6
1.2 Aktivierung und Funktion des Transkriptionsfaktors <i>nuclear factor kappa B</i>	7
1.2.1 <i>Nuclear factor kappa B</i> (NF- κ B)	7
1.2.2 Die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade	8
1.2.3 NF- κ B-Effekte auf die Skelettmuskulatur	10
1.2.4 Einfluss von Training auf den NF- κ B-Signalweg	11
1.2.5 Hemmung von NF- κ B durch Pyrrolidin-Dithiocarbamat.....	12
1.3 <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i> (TRAF6)	12
1.4 Die Rolle von TRAF6 und NF- κ B bei Kachexie	13
2. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
3.1.2 Standardpuffer und Lösungen	20
3.1.3 Antikörper.....	20
3.1.4 Primer.....	21
3.1.5 Kommerzielle Kits	22
3.1.6 Eukaryontische Zelllinien	22
3.1.7 Geräte	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	24
3.2.1.1 Kultivierung von C2C12-Zellen	24
3.2.1.2 Induktion der myogenen Differenzierung	25
3.2.1.3 Behandlung der Zellen mit PDTTC	25
3.2.1.4 Elektrische Pulsstimulation der Zellen (EPS)	26
3.2.2 Arbeit mit Versuchstieren	26
3.2.2.1 Mäusestamm.....	26

3.2.2.2 Laufbandtraining	26
3.2.2.3 „Akutgruppen“	27
3.2.2.4 „Chronische“ Gruppen	28
3.2.2.5 Tötung und Präparation der Versuchstiere	28
3.2.3 Proteinchemische Methoden	29
3.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Muskelgewebe.....	29
3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen	30
3.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
3.2.3.4 Immunologische Methoden.....	32
3.2.3.4.1 Western Blot	32
3.2.4 Molekularbiologische Methoden	35
3.2.4.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA	35
3.2.4.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe.....	35
3.2.4.3 Messung der RNA-Konzentration	35
3.2.4.4 Synthese von cDNA.....	36
3.2.4.5 Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	37
4. Ergebnisse.....	39
4.1 <i>In vitro</i> -Vorversuch	39
4.1.1 Einfluss einer EPS-Stimulation und einer PDTC-Behandlung auf C2C12-Zellen..	39
4.2 <i>In vivo</i> -Versuche am Mausmodell	41
4.2.1 Verhalten und makroskopischer Phänotyp der „chronischen“ Tiere im Experiment	42
4.2.2 Anpassung des Skelettmuskels an ein mehrwöchiges Lauftraining.....	44
4.2.2.1 Überprüfung der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC anhand der Konzentration des I κ B- α -Proteins	44
4.2.2.2 Einfluss der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC und des körperlichen Trainings auf die PGC-1 α -Proteinkonzentration im Skelettmuskel.....	46
4.2.2.3 Expression des <i>Traf6</i> -Gens nach NF- κ B-Hemmung durch PDTC und körperlichem Training auf Protein- und RNA-Ebene	48
4.2.2.4 Auswirkungen einer NF- κ B-Hemmung durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression metabolischer und mitochondrialer Marker	49
4.2.2.5 Auswirkung einer NF- κ B-Hemmung durch PDTC auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren	52
4.2.2.6 Auswirkungen einer NF- κ B-Hemmung durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression von <i>Myostatin</i>	54
4.2.2.7 Auswirkungen einer Hemmung von NF- κ B durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression von Genen, die für sarkomerassoziierte Chaperone (<i>Atrogin-1</i> , <i>Murf1</i> , <i>Smyd1</i> , <i>skNac</i>) kodieren	55

4.3 Reaktion des Skelettmuskels auf ein einmaliges Lauftraining	59
4.3.1 Verhalten der „Akutmäuse“ im Experiment	59
4.3.2 Einfluss der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC und eines einmaligen Lauftrainings auf die I κ B- α -, TRAF6- und PGC-1 α -Proteinkonzentration	59
4.3.2.1 Auswirkung der NF- κ B-Hemmung auf die Expression der für I κ B- α , TRAF6 und PGC1- α kodierenden Gene auf Proteinebene	59
4.3.3 Einfluss der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene	60
4.3.3.1 Auswirkungen einer NF- κ B-Hemmung durch PDTC und einer Laufbelastung auf die Expression entzündungsassoziierter Gene wie <i>Il-6r</i> , <i>Cxcl-5</i> und <i>Egr1</i>	60
4.3.3.2 Expression der mit Anti-Inflammation assoziierten Gene <i>Zfp36</i> , <i>Atf3</i> und <i>Maff</i> nach einer Hemmung von NF- κ B durch PDTC	62
4.3.3.3 Einfluss der Hemmung von NF- κ B und einer Laufbelastung auf Gene, die für Regulatoren des Skelettmuskelmetabolismus kodieren	66
5. Diskussion	68
5.1 Welche Effekte hat ein „chronisches“ Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität und wie erfolgt die Trainingsanpassung des Skelettmuskels unter NF- κ B-Inhibition?.....	68
5.1.1 Die „chronischen“ Tiere zeigten ein deutlich geringeres Stresslevel als die „Akutmäuse“	68
5.1.2 Die PDTC-behandelten Tiere wiesen eine deutlich inhomogenere Gewichtsentwicklung auf	69
5.1.3 Wie wirkt sich ein zehnwöchiges Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel aus?	69
5.1.4 Konnte die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel durch PDTC erfolgreich gehemmt werden?.....	70
5.1.5 Wie wirkt sich eine Kombination aus körperlichem Training und einer Hemmung der NF- κ B-Aktivität auf Genexpressionsmuster im Skelettmuskel aus?	72
5.1.5.1 Weder ein zehnwöchiges Lauftraining noch eine alleinige oder zusätzliche Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC wirken sich auf die <i>Pgc-1α</i> -Expression im Skelettmuskel aus	72
5.1.5.2 Das <i>Traf6</i> -Expressionsniveau wird weder durch ein Lauftraining noch durch die Gabe von PDTC beeinflusst.....	74
5.1.5.3 Ein Lauftraining und/oder eine PDTC-Gabe wirken sich im <i>M. tibialis anterior</i> nicht auf das Expressionsniveau metabolischer und mitochondrialer Gene aus	76
5.1.5.4 Es lassen sich keine Auswirkungen eines Lauftrainings und/oder einer PDTC-Gabe auf die Expression von <i>Myostatin</i> feststellen.....	78
5.1.5.5 Ein Lauftraining und/oder eine Hemmung von NF- κ B wirken sich im <i>M. tibialis anterior</i> moderat auf die Expression der für die Myosine <i>MyH1</i> , <i>MyH2</i> und <i>MyH7</i> kodierenden Gene aus.....	79

5.1.5.6 Ein Lauftraining und/oder eine PDTC-Gabe wirken sich teilweise auf die Expression von Genen aus, die für sarkomerassoziierte Proteine kodieren	80
5.2 Welche Effekte hat ein einmaliges „akutes“ Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität und wie erfolgt die Trainingsanpassung des Skelettmuskels unter NF- κ B-Inhibition?.....	84
5.2.1 Die Tiere der „Akutgruppe“ zeigten während der Laufbandexperimente keine Auffälligkeiten, jedoch phänotypisch ein höheres Stresslevel als die „chronischen“ Mäuse.....	84
5.2.2 Wie wirkt sich ein einmaliges Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel aus?.....	84
5.2.3 Konnte die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel durch PDTC erfolgreich gehemmt werden?.....	86
5.2.4 Wie wirken sich eine einmalige Akutbelastung sowie eine PDTC-Gabe auf Genexpressionsmuster im Skelettmuskel <i>M. tibialis anterior</i> aus?	88
5.2.4.1 Weder eine einmalige Laufbelastung noch eine alleinige oder zusätzliche PDTC-Gabe wirken sich auf die PGC-1 α - sowie die TRAF6-Proteinkonzentration im Skelettmuskel aus	88
5.2.4.2 Die Expression entzündungsassoziierter Gene wird durch eine Akutbelastung erhöht; durch die Gabe von PDTC wird dieser Effekt abgeschwächt.....	89
5.2.4.2.1 Eine Akutbelastung führt zu einer erhöhten Genexpression von <i>Il-6α</i> , welche durch eine PDTC-Behandlung reduziert wird	89
5.2.4.2.2 Die Expression von <i>Cxcl5</i> und <i>Egr1</i> ist nach einer Akutbelastung erhöht, der Effekt wird durch eine PDTC-Behandlung nivelliert	91
5.2.4.3 Eine einmalige Laufbelastung führt tendenziell zu einer erhöhten Expression von mit Anti-Inflammation assoziierten Genen; dieser Effekt wird durch eine PDTC-Behandlung abgeschwächt wird	93
5.2.4.3.1 Die Expression des <i>Zfp36</i> -Gens wird nach Laufbelastung unter PDTC-Behandlung signifikant reprimiert	93
5.2.4.3.2 Die Expression von <i>Atf3</i> unterliegt starken Schwankungen, zeigt jedoch tendenziell einen trainingsbedingten Anstieg, welcher nach einer PDTC-Gabe abgeschwächt wird	94
5.2.4.3.3 Die <i>Maff</i> -Expression ist nach Akutbelastung erhöht, ein Effekt, der durch PDTC-Behandlung abgeschwächt wird	94
5.2.4.4 Sowohl eine Laufbelastung als auch eine PDTC-Behandlung wirken sich auf Gene, die für Regulatoren des Skelettmuskelmetabolismus kodieren, aus	95
5.2.4.4.1 Die <i>Ppp1r3a</i> -Expression wird durch körperliches Training reprimiert; dies wird durch eine PDTC-Behandlung verstärkt.....	95
5.2.4.4.2 Die <i>Nr4a3</i> -Expression bleibt nach einem Trainingsreiz unverändert, eine PDTC-Behandlung verringert tendenziell die <i>Nr4a3</i> -Expression	97
5.3 Schlussfolgerung und Ausblick	99
6. Zusammenfassung.....	100
7. Summary.....	102

8. Literaturverzeichnis	104
9. Abkürzungsverzeichnis	116
10. Danksagung.....	119
11. Selbstständigkeitserklärung.....	120

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Plastizität der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur macht ungefähr 40 % der gesamten Körpermasse bei Säugetieren aus. Sie ist verantwortlich für lokomotorische Aktivitäten, die stabilisierende Körperhaltung sowie die Atmung und unterstützt wichtige Funktionen im Metabolismus sowie im Energieumsatz, wie z. B. bei der Wärmeproduktion (Übersichten bei Egan und Zierath, 2013; Wang und Pessin, 2013).

Der Skelettmuskel besteht aus mehreren Muskelfasern bzw. Myotuben. Diese entstehen aus Vorläuferzellen, den sogenannten Myoblasten, welche sich während der Embryonalentwicklung im Rahmen eines multifaktoriellen Prozesses zu spindelförmigen Myozyten differenzieren. Durch die Fusion mehrerer Myozyten zu einer mehrkernigen Zelleinheit (Synzytium) mit länglicher Form entsteht eine Myotube, die sogenannte Muskelfaser. Die Zellkerne liegen bei dieser randständig direkt unter der Zellmembran. Im Zytoplasma der Muskelfasern befinden sich zwischen den kontraktilen Einheiten, den Myofibrillen, die Mitochondrien. Die Myofibrillen entstehen durch eine Aneinanderreihung von Sarkomeren, welche die kleinste kontraktile Einheit des Skelettmuskels darstellen. Diese Sarkomere bestehen hauptsächlich aus den beiden Proteinen Aktin und Myosin, welche sich zusammen mit anderen Proteinen zu den sogenannten dicken (Myosin-) und dünnen (Aktin-) Filamenten zusammenlagern. Die Aktinfilamente sind in den Z-Scheiben verankert, welche die Sarkomere seitlich begrenzen. Die dicken Myosinfilamente sind mit ihren Schwänzen an der mittig im Sarkomer liegenden M-Bande fixiert, wohingegen die globulären Kopfbereiche in die Bereiche der Aktinfilamente hineinreichen. Bei einer Kontraktion gleiten die Aktin- und Myosinfilamente ineinander und das Sarkomer verkürzt sich somit. Hierfür ist die ATPase-Aktivität des Myosinkopfes nötig. Die elastische Verbindung der M-Bande mit der Z-Scheibe wird durch weitere Filamente, insbesondere dem Titinprotein, erbracht. Aufgrund der strukturellen Anordnung dieser beiden Myofilamente erscheint der Skelettmuskel im Lichtmikroskop quergestreift. Jede Muskelfaser wird von einer Basallamina umgeben. Im Zwischenraum zwischen dieser und dem Sarkolemm befinden sich die Satellitenzellen. Satellitenzellen können sich über längere Zeit selbst erneuern und proliferativ aktive Myoblasten generieren. Diese differenzieren dann zu Muskelfasern aus. Somit spielen Satellitenzellen eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Muskelfasern. Die Muskelfaser wird von einer Bindegewebsschicht, dem *Endomysium*, umhüllt. 20 bis 80 einzelne Muskelfasern werden von einer kollagenhaltigen Bindegewebsschicht, dem sogenannten *Perimysium*, umgeben und als Primärbündel oder Faszikel be-

zeichnet. Mehrere dieser Muskelbündel wiederum, welche vom sogenannten *Epimysium* und einer weiteren Bindegewebsschicht, der Faszie, umgeben werden, bilden zusammen den Skelettmuskel. Der Skelettmuskel selbst ist dann über Sehnen an den Knochen verankert (Clark *et al.*, 2002; Korthuis, 2011; Otto *et al.*, 2009) (Abb. 1).

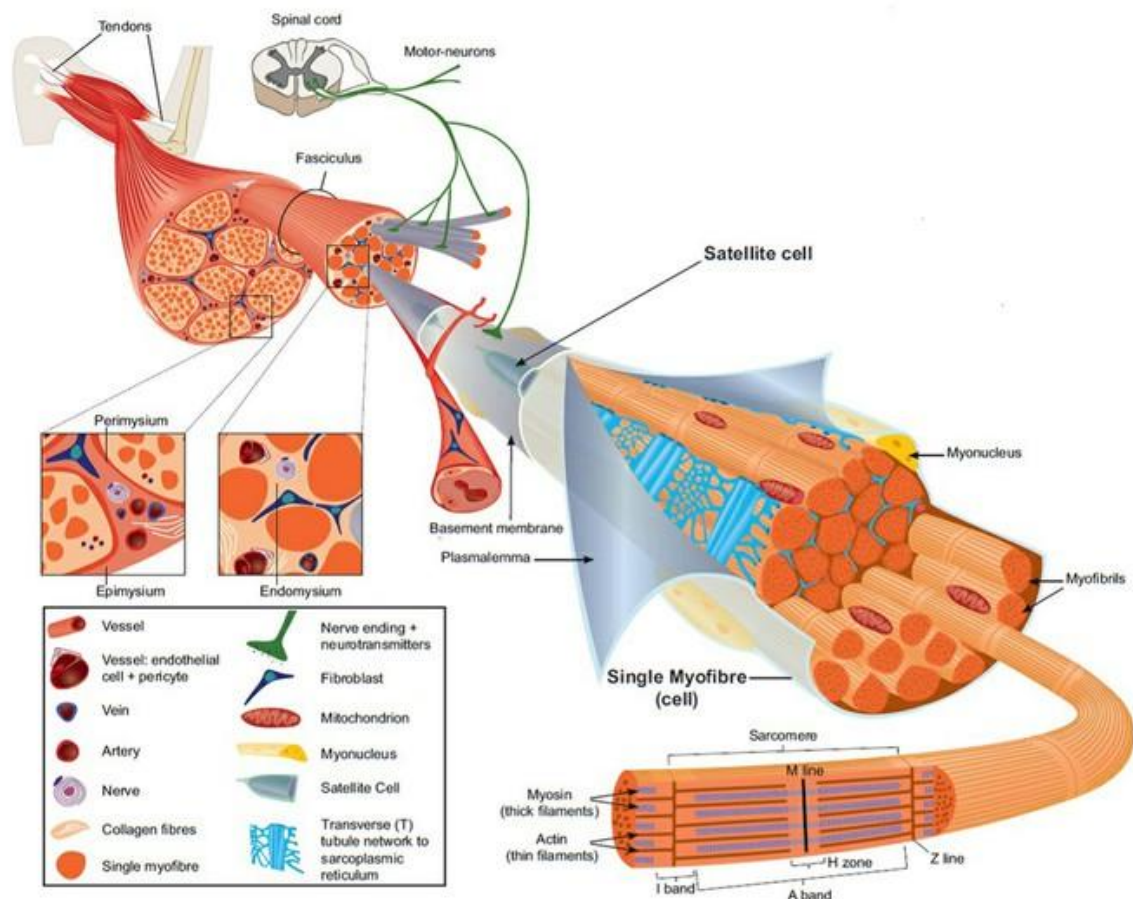


Abb. 1: Schematische Darstellung des Skelettmuskels und der mit diesem assoziierten Strukturen (Abbildung modifiziert nach Tajbakhsh, 2009)

1.1.1 Muskelfasertypen

Je nach Funktion verschiedener Skelettmuskeln im Organismus ergeben sich Unterschiede bezüglich deren Metabolismus und Struktur. Insbesondere existieren verschiedene Muskelfasertypen mit unterschiedlichen Eigenschaften, wobei in einem einzigen Muskel verschiedene Fasertypen vorkommen können.

Typ-I-Fasern weisen einen hohen Gehalt an Mitochondrien und eine gute Durchblutung auf. Dies ermöglicht ihnen eine langsame Kontraktion, einen überwiegend oxidativen Stoffwechsel und eine beachtliche Ermüdungsresistenz. Muskeln, die einen starken Anteil dieser Typ-

I-Fasern haben, zeigen aufgrund ihrer hohen Konzentration an Myoglobin, einem sauerstoffspeichernden Protein, eine rötliche Färbung und werden als sogenannte „rote Muskulatur“ charakterisiert. Typ-I-Fasern lassen sich hauptsächlich in Muskeln mit langsamen, sich wiederholenden Bewegungen und Muskeln zur Gewährleistung der Körperstellung finden.

Typ-IIa-Fasern kontrahieren dagegen schnell, ihr Stoffwechsel ist überwiegend oxidativ, teilweise auch glykolytisch und sie zeigen eine hohe Ermüdungsresistenz. Sie sind insbesondere für schnelle, sich wiederholende Bewegungsabläufe konzipiert.

Typ-IIx-Fasern weisen einen geringen Mitochondriengehalt, schnelle Kontraktionen, einen überwiegend glykolytischen Stoffwechsel und eine eher schnelle Ermüdung auf. Da die Myoglobinkonzentration gering ist, stellen sie die „weiße Muskulatur“ dar.

Muskelfasern vom **Typ-IIb** sind vornehmlich beim Nagetier zu detektieren. Diese Muskelfasern können am meisten Kraft und Leistung erbringen, kontrahieren somit sehr schnell und weisen aufgrund der geringen Mitochondrienzahl einen hauptsächlich glykolytischen Stoffwechsel auf. Die Myoglobinkonzentration ist wie bei den IIx-Fasern gering. Aufgrund der schnellen Kraftaufbringung in kürzester Zeit ermüden diese Fasern sehr schnell (Übersichten bei Egan und Zierath, 2013; Schiaffino und Reggiani, 2011; Wang und Pessin, 2013).

Die verschiedenen Skelettmuskelfasertypen enthalten charakteristische Isoformen der sogenannten schweren Kette des Sarkomerproteins Myosin (*myosin heavy chain*, MyHC), welche von den sarkomerischen Genen *MyH1-8* kodiert werden. So enthält der Fasertyp I vorwiegend MyHCI, welches von *MyH7* kodiert wird, der Fasertyp IIa MyHCIIa (*MyH2*) und der Fasertyp IIx/d insbesondere MyHCIIx/D (*MyH1*). Einzelne Skelettmuskelfasern können jedoch auch mehrere unterschiedliche MyHC-Isoformen enthalten. Solche als Hybridfasern bezeichneten Skelettmuskelfasern findet man vorwiegend während Umwandlungsprozessen zwischen den Muskelfasertypen (Brummer *et al.*, 2013). In der untenstehenden Tabelle 1 sind die Eigenschaften der verschiedenen Fasertypen zusammengefasst.

Die Masse und fasertypspezifische Zusammensetzung der Skelettmuskulatur eines Organismus ist abhängig vom Gleichgewicht zwischen Muskelfaserdegradations- und Muskelfaserbiosyntheseprozessen. Eine Muskelmassenzunahme kann z. B. infolge körperlichen Trainings erfolgen. Zu einer Skelettmuskelmassenabnahme kommt es z. B. durch Entlastung, im Alter (Sarkopenie), bei Hungerzuständen oder im Zusammenhang mit verschiedenen chronischen Erkrankungen, die mit einer *low grade*-Entzündungsantwort einhergehen, z. B. aus dem onkologischen oder dem Herz-Kreislauf-Spektrum (Kachexie). Aufgrund ihres unterschiedlichen physiologischen und metabolischen Charakters sind die verschiedenen Skelettmuskelfasertypen unterschiedlich sensitiv gegenüber spezifischen pathophysiologischen

Signalen, welche zur Skelettmuskelatrophie führen. So sind z. B. rote, oxidative Typ-I-Fasern aufgrund ihrer höheren Proteinsynthese resistenter gegenüber einer Nahrungskarenz oder auch gegenüber chronischer Inflammation als glykolytische Typ-II-Fasern. Jedoch sind Typ-I-Fasern anfälliger für eine durch Inaktivität oder Denervierung verursachte Skelettmuskelatrophie (Wang und Pessin, 2013).

Fasertyp	I	Ila	Ild (Ilx)	Ilb
Vorkommen	alle Säuger	alle Säuger	alle Säuger	Nagetiere
Farbe	rot	rot	weiß	weiß
Vorherrschende MyHC-Isoform	I (<i>MyH7</i>)	Ila (<i>MyH2</i>)	Ild (Ilx) (<i>MyH1</i>)	Ilb
Ermüdbarkeit	niedrig	mittel	hoch	sehr hoch
Kontraktionsgeschwindigkeit	langsam	schnell	schnell	sehr schnell
Metabolismus	oxidativ	oxidativ	glykolytisch	glykolytisch
Mitochondrien- und Myoglobingehalt	hoch	hoch	gering	gering
ATPase Aktivität des Myosins	niedrig	niedrig	hoch	hoch

Tab. 1 Übersicht und Eigenschaften der verschiedenen Fasertypen

(modifiziert nach Wang und Pessin, 2013)

1.1.2 Trainingsbedingte Anpassungsreaktionen des Skelettmuskels

Die Skelettmuskulatur kann sich über verschiedene kurz- und langfristige Strategien sehr gut an körperliches Training anpassen. Dieser Vorgang wird als Plastizität bezeichnet (Übersichten bei Egan und Zierath, 2013; Harridge, 2007; Hoppeler *et al.*, 2011; Steinacker *et al.*, 2002). Eine wichtige Rolle spielen dabei die bereits beschriebenen Myosin-Schwerketten-Isoformen (MyHC), welche die Funktion und die Struktur des Muskels beeinflussen. Durch einen oder mehrere Trainingsreize kommt es verstärkt zur Bildung oder zum Abbau bestimmter MyHC-Isoformen, welche schließlich zu einer Änderung des Fasertyps führen. So führt ein Krafttraining z. B. vermehrt zum Aufbau schneller Fasern und insgesamt zur Muskelfaserhypertrophie. Hierbei spielt insbesondere der Akt/mTOR (aktivierte Proteinkinase B / *mammalian target of rapamycin*)-Signalweg eine wichtige Rolle (Übersicht bei Schiaffino *et al.*, 2013). Ein Ausdauertraining führt dagegen zur vermehrten Ausprägung eines eher

oxidativen Muskelfaserphänotyps und kaum zu hypertrophen Anpassungsprozessen (Übersichten bei Hoppeler *et al.*, 2011; Steinacker *et al.*, 2002).

1.1.2.1 Metabolische Veränderungen

Während der durch Ausdauertraining hervorgerufenen Ausprägung des oxidativen Muskelfaserphänotyps, kommt es zu einer Zunahme an Kapillaren und Mitochondrien um bis zu 30 % (Übersichten bei Hoppeler *et al.*, 2011; Steinacker *et al.*, 2002). Dabei spielen der Energiestatus der Muskelzelle, welcher über die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) reguliert wird, Kalziumströme und reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) eine große Rolle. Es kommt somit zu Veränderungen auf metabolischer Ebene, welche sich hauptsächlich in einer veränderten Expression von Genen äußern, die für Transport- und Membranproteine und/oder Enzyme des Zitratzyklus' und der Atmungskette kodieren. Dabei werden insbesondere die in Abb. 2 dargestellten metabolischen und mitochondrialen Marker durch ein Training beeinflusst.

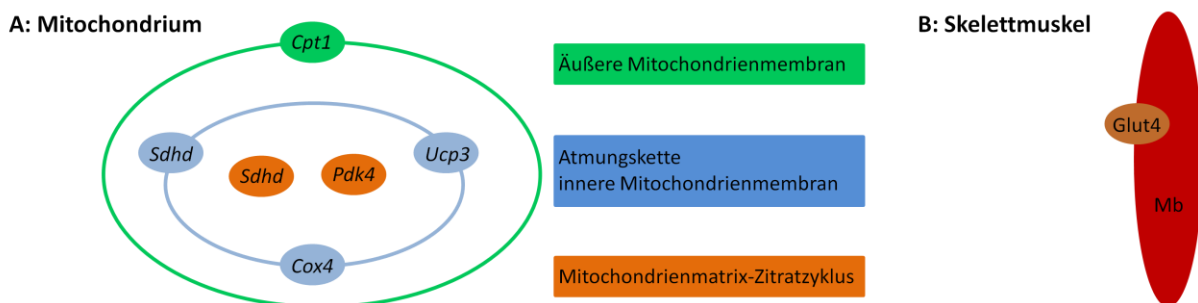


Abb. 2: Metabolische und mitochondriale Marker, die durch Training verändert werden

A: Durch Training wird die Expression der Gene *succinate dehydrogenase complex subunit D* (*Sdhc*) und *pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4* (*Pdk4*) beeinflusst, die für Enzyme des Zitratzyklus' kodieren. SDHC koppelt zudem den Zitratzyklus an die Atmungskette (Kwon und Harris, 2004; Rutter *et al.*, 2010). *Cytochrome c oxidase subunit 4* (*Cox4*) und *uncoupling protein 3a* (*Ucp3*) kodieren für Atmungskettenproteine (Liang *et al.*, 2016; Nabben und Hoeks, 2008). *Carnitine palmitoyltransferase 1* (*Cpt1*) kodiert für ein Protein, das den Fettsäuretransport ins Mitochondrium ermöglicht (López-Viñas *et al.*, 2007). **B:** *Glucose transporter type 4* (GLUT4) sorgt als transmembranäres Protein für die Aufnahme von Glukose in Muskel- und Fettzellen (Antonescu *et al.*, 2009). Innerhalb der Muskulatur wird die Konzentration des sauerstoffspeichernden Myoglobins (Mb) durch körperliche Aktivität beeinflusst (Ordway und Garry, 2004).

Des Weiteren sind die *Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3 a* (PPP1R3A), welche in den Glykogenmetabolismus des Skelettmuskels involviert ist (Übersicht bei Newgard *et al.*, 2000) sowie der *Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3* (NR4A3) bei metabolischen Veränderungen im Skelettmuskel von Bedeutung. So spielt NR4A3 eine große Rolle im

Energiemetabolismus und in der akuten Anpassungsreaktion in Antwort auf einen Trainingsreiz (Catoire *et al.*, 2012).

Eine weitere wichtige Regulation des Metabolismus wird über die *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR)-Familie von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Sie ist wichtig für die Regulation des Fettstoffwechsels und verschiedene Entzündungsvorgänge. PPAR alpha/delta spielt dabei in der Skelettmuskulatur die größte Rolle, indem es bei einem Ausdauertraining Veränderungen hin zu einem eher oxidativen Muskelfaserphänotyp fördert. Letztendlich aktivieren die bisher bekannten, durch Ausdauertraining induzierten Signaltransduktionskaskaden den transkriptionellen Regulator *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha* (PGC-1 α) (Übersicht bei Hoppeler *et al.*, 2011). Dieser ist selbst kein Transkriptionsfaktor, sondern fungiert als transkriptioneller Koaktivator, d. h. er steuert indirekt über andere Transkriptionsfaktoren den muskulären Metabolismus und die mitochondriale Biogenese (Übersicht bei Hoppeler *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Die Expression des *Pgc-1 α* -Gens ist in verschiedenen Muskelfasertypen unterschiedlich stark: So ist eine höhere Expression in langsam kontrahierenden Typ I-Muskelfasern wie z. B. dem *M. soleus* und eine niedrigere hingegen in Muskeln mit vorwiegend Typ II-Muskelfasern wie z. B. dem *M. extensor digitorum longus* vorzufinden. Des Weiteren spielt PGC-1 α eine wichtige Rolle bei Umwandlungen der einzelnen Muskelfasertypen ineinander, den sogenannten *fiber type switches*. In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Pgc-1 α* , sobald es ein ausreichend hohes Expressionsniveau erreicht, dazu in der Lage ist, in Typ II-Muskelfasern eine höhere Expression mitochondrialer Gene zu bewirken und somit einer Ermüdung entgegenzuwirken. Die nach Ausdauertraining induzierte *Pgc-1 α* -Expression hat einen ähnlichen Effekt, bewirkt also ebenfalls die Ausprägung eines stärker oxidativen Phänotyps in Typ II-Fasern (Übersicht bei White *et al.*, 2008).

1.1.2.2 Auf-, Ab- und Umbauprozesse im Sarkomer

Weiterhin werden im Rahmen dieser Trainingsanpassungsvorgänge auch verschiedene molekulare Chaperone (*chaperone*: engl. „Anstandsdame“) beeinflusst. Diese spielen u. a. bei Um- und Abbauprozessen von Proteinen und Proteinkomplexen, im Skelettmuskel insbesondere im Bereich der Sarkomere, eine Rolle (s. Abb. 3). Dabei stehen die Chaperone skNAC und SMYD1 sowie insbesondere die Expression der muskelspezifischen E3-Ubiquitin-Ligasen *Atrogin-1* und *muscle ring-finger protein-1* (MURF1) im Fokus.

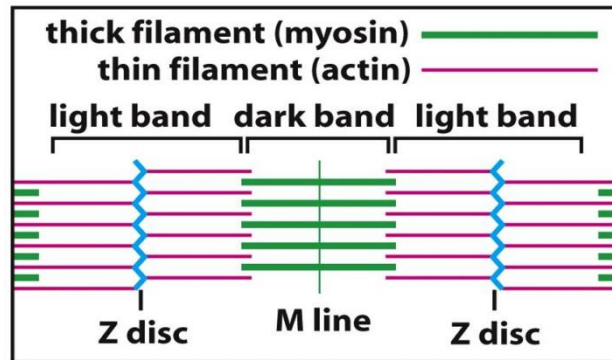


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Sarkomers im gedehnten Skelettmuskel

(Abb. entnommen aus „Molecular biology of THE CELL“, Alberts *et al.*, 2007)

1.2 Aktivierung und Funktion des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B*

1.2.1 *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B)

Auf verschiedene Stimuli von außen reagiert die Zelle mit veränderter Genexpression, welche über sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Thanos und Maniatis, 1995). *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) ist ein solcher ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor. Er wurde 1986 zum ersten Mal durch Sen und Baltimore in murinen B-Zellen beschrieben. Dabei konnten die Autoren eine regulierende Funktion auf die Gene nachweisen, die für die leichten κ -Ketten der Immunglobuline kodieren. Die Bezeichnung NF- κ B stellt eigentlich einen Obergriff für eine Familie eukaryontischer Transkriptionsfaktoren dar, welche sich aus Proteinen der Rel-Familie zusammensetzen. Zur NF- κ B/Rel-Familie gehören die Untereinheiten p50 (NF- κ B 1), p52 (NF- κ B 2), p65 (RelA), RelB und c-Rel. Charakteristisch für alle Mitglieder der NF- κ B/Rel-Familie ist die N-terminal gelegene, aus 300 Aminosäuren bestehende *Rel homology domain* (RHD). Diese Domäne interagiert mit den NF- κ B inhibierenden Proteinen ($I\kappa$ Bs), enthält das Kernlokalisierungssignal, ist für die Homo-/Heterodimerisierung (s.u.) verantwortlich und bindet die DNA über sogenannte „ κ B-sites“ der Dimere. Strukturell kann man die NF- κ B-Proteine in zwei Gruppen einteilen. Zur einen Gruppe gehören p50 und p52, welche durch eine ubiquitinvermittelte limitierte proteolytische Prozessierung aus den zunächst gebildeten Vorläuferproteinen p105 bzw. p100 hervorgehen. Bei den Mitgliedern der anderen Gruppe (RelA, Relb und c-Rel) erfolgt die Synthese als reifes Protein (Übersicht bei Ghosh *et al.*, 2012; Mourkioti und Rosenthal, 2008). Sie besitzen am C-terminalen Ende transkriptionsaktivierende Domänen (TAD's) durch welche sie als Aktivatoren der Transkription fungieren (O'Shea und Perkins, 2008). Die Mitglieder der NF-

κ B-Familie liegen generell als Homo- oder Heterodimere vor. Am häufigsten kommt es zu einer Kombination aus einem Nicht-Rel-Protein und einem Rel-Protein, wobei sich vorwiegend das Dimer p50/p65 bildet (Übersicht bei Ghosh *et al.*, 2012; Minegishi *et al.*, 2015). Die NF- κ B-Zielsequenz findet sich in zahlreichen Genen – somit werden durch diesen Transkriptionsfaktor eine Vielzahl verschiedener Gene reguliert (Übersichten bei Ghosh *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2004).

1.2.2 Die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade

Die Regulation der NF- κ B-Aktivierung erfolgt posttranskriptionell und posttranslational, d. h. NF- κ B muss in Antwort auf ein aktivierendes Signal nicht neu synthetisiert werden, sondern liegt in der Zelle bereits in inaktivem Zustand vor. Hierbei befindet sich das Protein hauptsächlich im Zytoplasma und ist dort an eines der inhibitorischen I κ B-Proteine (I κ B- α , I κ B- β oder I κ B- ϵ) gebunden (Übersicht bei Ghosh und Hayden, 2012).

Das inhibitorische Protein I κ B- α ist wissenschaftlich am besten untersucht. Es bindet an p50/p65-Dimere und maskiert deren Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence* = NLS). Da die NLS der p50-Untereinheit jedoch nicht maskiert wird, kann es trotzdem zu einem Transport von NF- κ B in den Zellkern kommen, was jedoch wiederum durch eine Kernexportsequenz (*Nuclear export sequence* = NES) des I κ B- α rückgängig gemacht wird. Die Aktivierung dieser inaktiven Dimere wird durch eine Vielzahl von Stimuli wie z. B. physikalischen Reizen (UV-Licht, ionisierende Strahlung), biochemische Reize und Botenstoffe (proinflammatorische Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren) oder auch infektiösen Geschehnissen (Bakterien, Viren, Parasiten) bewirkt (Übersicht bei Ghosh *et al.*, 2012; Thanos und Maniatis, 1995).

Je nach Signal werden vor der Aktivierung von NF- κ B verschiedene Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt. Hierbei kann NF- κ B über zwei verschiedene Signalwege aktiviert werden (Abb. 4).

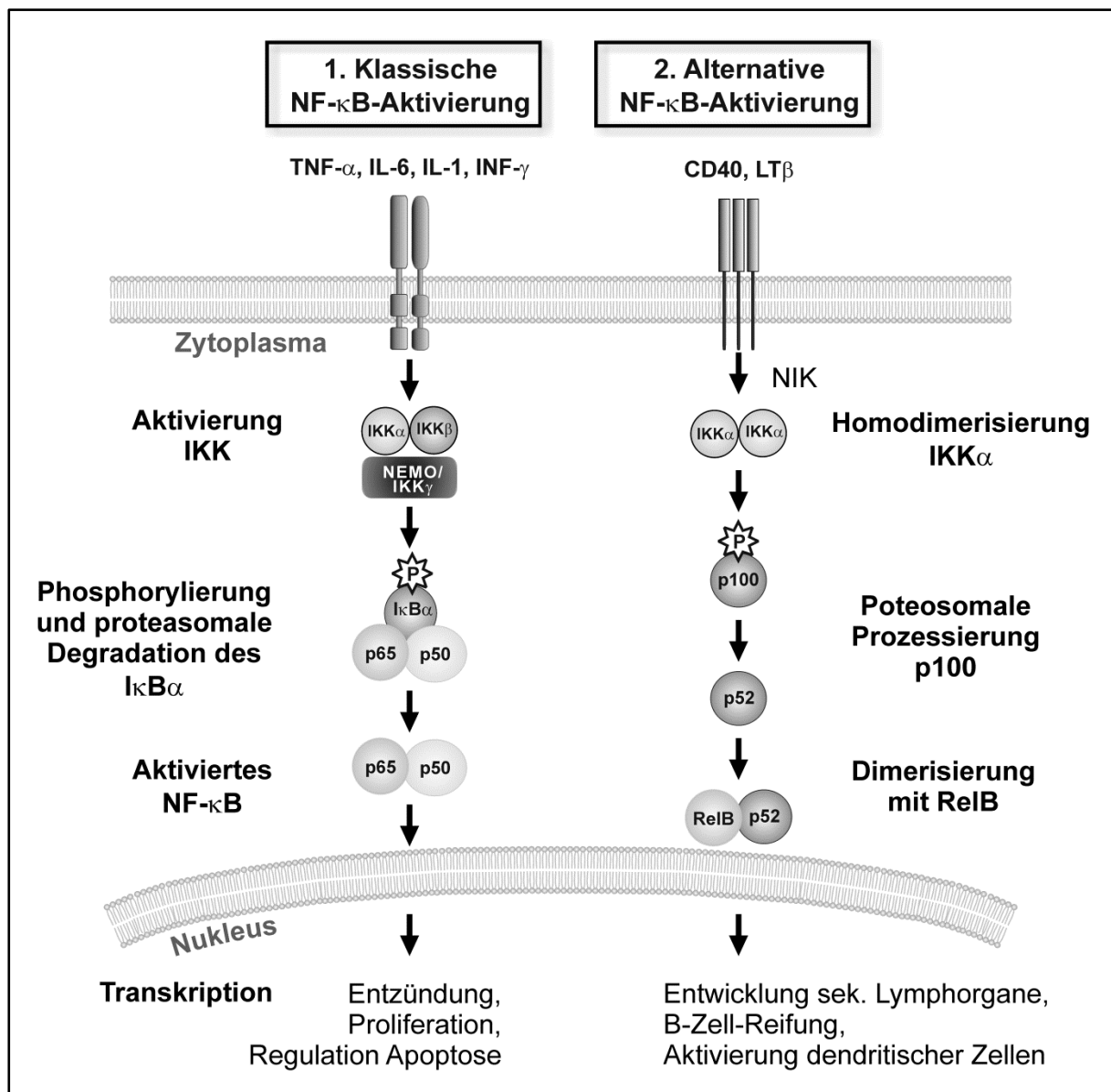


Abb. 4: Schematische Darstellung des klassischen und des alternativen Signalweges der NF-κB-Aktivierung (modifiziert nach Sun, 2011)

1. Klassischer Weg: Bei einer Bindung der verschiedenen Liganden an Rezeptoren aus der Toll-like Rezeptoren (TLR-), der Interleukin-18 (IL-18)-, der Interleukin-1(IL-1)-Rezeptoren- oder der *Tumor necrosis factor*-(TNF)-Rezeptor-Superfamilie sowie an B- und T-Zell-Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung des $I\kappa B$ -Kinase-Komplexes (IKK). Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten. Die Serin/Threonin-Kinasen ($IKK\alpha$) und $I\kappa B$ -Kinase- β ($IKK\beta$) bilden dabei die katalytischen Einheiten und $IKK\gamma$ die regulatorische Einheit. Durch die Aktivierung des IKK-Komplexes kommt es zur Phosphorylierung und proteasomalen Degradation des $I\kappa B\alpha$. Das aktivierte NF-κB kann nun in den Zellkern gelangen, wo es an die entsprechenden Zielgene bindet.

2. Alternativer Weg: Binden die Liganden jedoch an einen Rezeptor der Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie wie an einen *Lymphotoxin β* ($LT\beta$)-, einen *Cluster of differentiation 40* (CD 40)-

oder einen *B-cell activating factor* (BAFF)-Rezeptor, läuft ein anderer Signalweg ab. Durch die aktivierte NF- κ B-*inducing kinase* (NIK) kommt es zu einer Homodimerisierung von IKK α . Diese führen zu einer Phosphorylierung und anschließenden proteasomalen Prozessierung vom inaktiven Vorläuferprotein p100 zur aktiven NF- κ B-Untereinheit p52. Die p52-NF- κ B-Dimere können nun in den Zellkern translozieren (Übersichten bei Ghosh *et al.*, 2012; Ghosh und Hayden, 2012; Hoesel und Schmid, 2013; Liu *et al.*, 2012; Mourkioti und Rosenthal, 2008; Moynagh, 2005).

Die von NF- κ B aktivierten Zielgene sind, wie oben bereits erwähnt, vielfältig. So gehören zu diesen u. a. für Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α), Akut-Phase-Proteine (Komplementfaktoren, Angiotensinogen), Immunrezeptoren (MyHC-Proteine), Signaltransduktionsproteine (z. B. TRAF-Proteine) oder Wachstumsfaktoren kodierende Gene (Übersicht bei Ghosh *et al.*, 2012). Der alternative Signalweg reguliert im Gegensatz zum klassischen Weg eher sehr spezifische biologische Funktionen, wie die Entwicklung sekundärer Lymphorgane, die Reifung und das Überleben von B-Zellen, den Metabolismus des Knochenmarks und die Aktivierung von dendritischen Zellen (Sun, 2011). NF- κ B kann nicht nur schnell aktiviert, sondern auch wieder schnell deaktiviert werden: Das Protein induziert die Bildung seines eigenen Inhibitors I κ B- α . Dieses neu synthetisierte I κ B- α gelangt in den Zellkern, bindet NF- κ B und der Komplex gelangt aufgrund der NES des I κ B- α s wieder zurück ins Zytoplasma (Übersicht bei Hoesel und Schmid, 2013).

1.2.3 NF- κ B-Effekte auf die Skelettmuskulatur

Wenngleich NF- κ B vermutlich sowohl in der sich entwickelnden Muskulatur als auch im reifen Skelettmuskelgewebe vielfältige Funktionen ausübt, ist dies bis heute wenig untersucht. In Bezug auf die sich entwickelnde Muskulatur existieren zudem kontroverse Daten: Manche Autoren beschreiben einen kontinuierlichen Anstieg der NF- κ B-Aktivität im Verlauf der Myogenese (Conejo *et al.*, 2002), andere konnten einen nur vorübergehenden Anstieg (Li und Schwartz, 2001) oder auch eine Abnahme der NF- κ B-Aktivität während der Skelettmuskeldifferenzierung (Guttridge *et al.*, 2000; Lehtinen *et al.*, 1996; Munz *et al.*, 2002) beobachten. In Bezug auf den adulten Muskel zeigen verschiedene Untersuchungen, dass eine erhöhte NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel die Expression der Gene reduziert, die an der Regeneration und am Aufbau der Muskulatur beteiligt sind. Insbesondere stimuliert NF- κ B, wie oben beschrieben, apoptotische Prozesse, beeinflusst die Differenzierung von Satellitenzellen und hemmt den an der Muskeldifferenzierung und -regeneration beteiligten Transkriptionsfaktor MyoD. Abbauprozesse des Skelettmuskelgewebes induzieren dann eine erhöhte Produktion von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), welcher die NF- κ B-Aktivität weiter ankurbelt (Guttridge *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1998). Jackman *et al.* konnten 2013 nachweisen,

dass NF- κ B nicht nur durch die Förderung kataboler Vorgänge, sondern auch durch die Hemmung anaboler Prozesse zum Verlust an Skelettmuskelmasse und somit zur Kachexie bei Patienten führt.

1.2.4 Einfluss von Training auf den NF- κ B-Signalweg

Jede körperliche Betätigung führt zu einer sogenannten systemischen Entzündungsantwort im Körper. Dabei kommt es zu einer starken Konzentrationserhöhung proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. Interleukin-6 (IL-6), Interferon γ (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Saini *et al.*, 2006), welche von den Muskelzellen, Immunzellen und Tumorzellen gebildet werden (Übersicht bei Shephard, 2002). Diese induzieren verschiedene Signaltransduktionskaskaden, welche meist zu einer Aktivierung von NF- κ B führen.

Es existieren nur wenige Forschungsarbeiten darüber, wie die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade durch körperliches Training beeinflusst wird, bzw. es fehlen systematisch durchgeführte Studien, insbesondere standardisierte Tierversuche. Die meisten vorhandenen Daten basieren zudem auf sehr kleinen Kollektiven und sind aufgrund ihrer Heterogenität bezüglich Tierarten/-stämmen, Trainingsprotokollen und methodischen Parametern nur eingeschränkt miteinander vergleichbar (Brooks *et al.*, 2008; Jackman *et al.*, 2013; Vogiatzis *et al.*, 2010). Trotzdem lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Mehrzahl der durchgeführten Studien grundsätzlich eine NF- κ B-Aktivierung in Antwort auf einen akuten Trainingsreiz zeigen (Ji *et al.*, 2004; Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007; Vella *et al.*, 2012), was eine Rolle dieses Transkriptionsfaktors bei der Trainingsanpassung wahrscheinlich macht. Dabei konnte die höchste NF- κ B-Aktivität meist zwei bis vier Stunden nach der Trainingseinheit gemessen werden (Ji *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2012).

Effekte von regelmäßigem, „chronischen“ Training auf den NF- κ B-Signalweg sind bisher ebenfalls kaum systematisch untersucht worden bzw. werden sehr unterschiedlich diskutiert: Einerseits konnten bei einem Ausdauertraining eine NF- κ B-Reduktion beobachtet werden (Brooks *et al.*, 2008; Vogiatzis *et al.*, 2010), andererseits gibt es auch Publikationen, welche eine erhöhte NF- κ B-Aktivität postulieren (Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007).

Schließlich ist zu einer potentiellen Funktion von NF- κ B bei der Trainingsanpassung überhaupt nichts bekannt, d. h. bisher gibt es keine Studie, in der untersucht wurde, wie sich eine Hemmung dieses Transkriptionsfaktors auf die Skelettmuskeladaptation an Training auswirkt.

1.2.5 Hemmung von NF-κB durch Pyrrolidin-Dithiocarbamat

Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC) gehört zur Gruppe der Dithiocarbamate (Abb. 5).

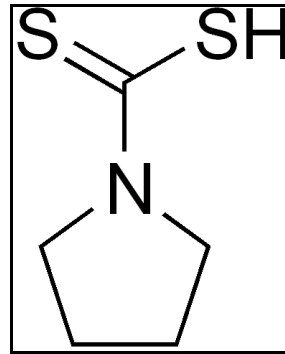


Abb. 5: Formel von PDTC

Dithiocarbamate wirken u. a. als Antioxidantien und werden in der Medizin vielfältig z. B. als Chelatbildner bei Metallvergiftungen (Cuzzocrea *et al.*, 2002), bei Alkoholmissbrauch und bei verschiedenen Virusinfektionen (Rhinovirus, Coxsackievirus) eingesetzt (Chabicovsky *et al.*, 2010). Zudem haben sie eine starke NF-κB-inhibierende Aktivität. PDTC gilt dabei als besonders effektiver NF-κB-Inhibitor, da es die Zellmembran durchdringen kann und über längere Zeit in Lösungen mit physiologischem pH stabil ist (Cuzzocrea *et al.*, 2002). Dithiocarbamate hemmen NF-κB, indem sie die Phosphorylierung von IκB-α und damit die IκB-α-Degradation verhindern. Dies resultiert in einer fehlenden Translokation von NF-κB in den Zellkern, somit wird die Bindung von NF-κB an die DNA gehemmt (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Hayakawa *et al.*, 2003; Schreck *et al.*, 1992).

PDTC wurde bereits in vielen Tierversuchen im Maus-/Rattenmodell u. a. intranasal/inhalativ (Chabicovsky *et al.*, 2010), oral (Chabicovsky *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2009; Mariappan *et al.*, 2010), intraperitoneal (Chen *et al.*, 2015; Cuzzocrea *et al.*, 2002) und intravenös (Chabicovsky *et al.*, 2010; Nai *et al.*, 2007; Parodi *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2011) eingesetzt. So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bezüglich der Frequenz und Dosierung auf etablierte Applikations-Protokolle zugegriffen werden.

1.3 Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF6)

Tumor Necrosis Factor Receptor-associated factor (TRAF)-Proteine sind Adaptorproteine, die bis auf TRAF4, welches hauptsächlich als Kernprotein vorkommt, im Zytoplasma lokalisiert sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der Toll-/IL-1- und der TNF-Rezeptorfamilie. TRAF-Proteine sind dadurch an der Regulation der Zellproliferation, der Regulierung der Apoptose sowie der Entzündungs- und Immunreaktion beteiligt (Bradley und Pober 2001; Hostager *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2004).

Bisher sind sieben verschiedene Mitglieder (TRAF1 bis TRAF7) der TRAF-Familie bekannt. Gemein ist allen Mitgliedern eine charakteristische TRAF-Domäne, welche in eine aminoternale TRAF-N-Region (Aktivierung von NF- κ B) und eine carboxyterminale TRAF-C-Region (Kontakt zu entsprechendem Rezeptor) unterteilt ist (Übersicht bei Kumar *et al.*, 2012).

TRAF6 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 63 kDa. Es weicht in der TRAF-C-Region strukturell von den anderen TRAF-Proteinen ab und besitzt zudem eine eigene Bindungsstelle innerhalb des *cluster of differentiation 40* (CD-40)-Rezeptors (Übersicht bei Kumar *et al.*, 2012). TRAF6 leitet Signale von Mitgliedern der IL-1/Toll-Rezeptorfamilie (IL-1, TLR2, TLR4) und von Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie (CD40, RANK, d. h. *Receptor activator of NF- κ B*) in die Zelle weiter. Es ist auch in die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen JNK und p38 involviert (Übersichten bei Arch *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2012; Bradley und Pober, 2001; Moynagh, 2005). TRAF6 spielt zudem eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von NF- κ B über TNF-, IL- und TL-Rezeptoren (Übersicht bei Kumar *et al.*, 2012). Durch die Bindung eines Liganden kommt es zur Konformationsänderung des jeweiligen Rezeptors (TNFR, TLR, ILR). Dies führt zur Phosphorylierung der *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK), welche an TRAF6 bindet. TRAF6 aktiviert die *transforming growth factor β -activated kinase* (TAK1) und andere *mitogen-activated protein kinase kinases* (MAP3Ks). Dies resultiert in einer Aktivierung des IKK (Moynagh, 2005). Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem 2011 nachweisen, dass TRAF6 die Skelettmuskelzellendifferenzierung negativ beeinflusst (Mueck *et al.*, 2011).

1.4 Die Rolle von TRAF6 und NF- κ B bei Kachexie

Als Kachexie bezeichnet man eine sehr starke Abmagerung, welche nicht nur mit einem Abbau der Speicherfettdepots einhergeht, sondern auch zu einem starken Muskelverlust führt. Dabei ist die Entwicklung einer Kachexie allgemein ein negativer prognostischer Faktor in Bezug auf viele Grunderkrankungen (Übersicht bei Argilés *et al.*, 2005; Axiak und Johnson, 2012; Übersicht bei Bauer *et al.*, 2008; Freeman, 2012; Übersicht bei Lenk *et al.*, 2010; Tisdale, 2000). Kachektische Krankheitsbilder werden bei vielen verschiedenen Spezies beobachtet, im veterinärmedizinischen Bereich z. B. häufig beim Rind im Zusammenhang mit Parasitosen oder chronischen Erkrankungen wie Enteritis, Ketose, Mastitis oder Salmonellose (Hofman *et al.*, 2005). Weiterhin ist ein kachektischer Phänotyp im Kleintierbereich u. a. mit Nieren-, Herz- und Lungenleiden sowie mit vielen Tumorerkrankungen assoziiert (Freeman, 2012). Auch bei der Spezies Pferd spielen kachektische Prozesse im Rahmen chronischer Grunderkrankungen sowie paraneoplastischer Symptome eine Rolle (Übersicht bei

Axiak und Johnson, 2012). Die zur Kachexie führenden Mechanismen sind nur teilweise erforscht (Übersichten bei Argilés *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2008; Lenk *et al.*, 2010). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass bei Kachexie im Rahmen chronischer Erkrankungen die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-6, IFN- γ oder TFN- α erhöht ist (Saini *et al.*, 2006). Durch diese extrazellulären Zytokine werden verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktiviert, welche über membranständige und intrazelluläre Adapterproteine weitergeleitet werden. Zu diesen Proteinen gehört auch das TRAF6-Protein, welches, wie in Abschnitt 1.3 dargestellt, über eine Aktivierung der I κ B-Kinase letztendlich zu einer Aktivierung von NF- κ B führt (Moynagh, 2005). NF- κ B selbst fördert, wie in 1.2.3 dargestellt, katabole Prozesse und wirkt hemmend auf anabole Vorgänge in der Skelettmuskulatur (Übersicht bei Jackman *et al.*, 2013; Li *et al.*, 1998; Tisdale, 2000).

Zur Therapie der Kachexie gab und gibt es zahlreiche Ansätze. Insbesondere wurde bisher versucht, einzelne Bestandteile „kachektischer“ Signaltransduktionskaskaden, wie den NF- κ B-Weg, zu beeinflussen. Unter anderem wurde z. B. versucht, NF- κ B durch verschiedene Nahrungsergänzungsmittel mit bekannter NF- κ B-inhibierender Aktivität, wie Curcumin, zu blockieren (Gupta *et al.*, 2011). Jedoch waren diese Ansätze nur wenig erfolgreich (Übersicht bei Saini *et al.*, 2006; Van Gammeren *et al.*, 2009; Yamaki *et al.*, 2012).

Interessanterweise konnte jedoch ein skelettmuskelspezifischer *Knockout* des *Traf6*-Gens in tumortragenden Mäusen eine deutliche Reduktion typischer Kachexie-Merkmale, wie z. B. Skelettmuskelmasse- und Muskelproteinverluste, erzielen, was insbesondere auf einer geringeren Induktion kataboler Prozesse beruhte (Übersicht bei Kumar *et al.*, 2012). Auch bei einer durch Nahrungskarenz ausgelösten Kachexie, konnte durch ein Fehlen von TRAF6 die Expression von „Autophagie-Genen“, signifikant gehemmt werden (Paul *et al.*, 2012).

In humanen Patienten ist bisher körperliches Training der einzige präventiv und therapeutisch wirksame Ansatz in Bezug auf einen kachexieassoziierten Verlust an Skelettmuskelgewebe. Jedoch sind die genauen Mechanismen dieser Kachexie-protectiven Wirkung noch nicht bekannt. Man geht davon aus, dass die Wirkung des Trainings darauf beruht, dass verschiedene katabole Signalwege gleichzeitig gehemmt und anabole Prozesse induziert werden („*polypill*“). Belege für diese Hypothese gibt es jedoch bisher kaum. Insbesondere ist völlig unklar, ob Training, zumindest zum Teil, über eine Beeinflussung der kachexieauslösenden Faktoren TRAF6 und NF- κ B wirksam wird (Übersichten bei Argilés *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2008; Lenk *et al.*, 2010).

Paradox erscheint zunächst die Tatsache, dass körperliches Training einerseits, wie unter 1.2.4 dargestellt, eine systemische Inflammation und in vielen Fällen vermutlich in Antwort darauf, wohl auch eine NF- κ B-Aktivierung im Skelettmuskel induziert. Andererseits findet man aber gerade bei kachektischen Patienten erhöhte Entzündungsparameter, welche auch

z. T. als kachexieauslösend gelten. Ein Erklärungsansatz für diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Befunde könnte sein, dass eine kurzzeitige, gut kontrollierte Entzündungsantwort für eine Trainingsanpassung des Skelettmuskels und damit möglicherweise auch als eine Kachexieprävention notwendig sein könnte, während eine chronische, *low grade*-Entzündungsantwort, wie man sie bei vielen kachektischen Patienten findet, kontraproduktiv sein könnte. Diese Hypothese kann geprüft werden, indem man die Trainingsanpassung des Muskels unter antiinflammatorischer bzw. NF- κ B-inhibierender Medikation untersucht.

Die genaue Kenntnis der entsprechenden Mechanismen ist wichtig, um hieraus unter anderem Implikationen für den human- und tiermedizinischen Klinikalltag ableiten zu können, beispielsweise hinsichtlich der Frage, ob und ggf. wie eine antiinflammatorische Medikation parallel zu einer konservativen Therapie, mit dem Ziel des Muskelaufbaus, den Trainingserfolg bei Mensch und Tier beeinträchtigen könnte. Zudem könnten sich Erkenntnisse bezüglich der bisher noch ungeklärten Frage ergeben, wie ein optimaler Trainings- und Medikationsplan für Tiere mit einem „chronisch-inflammatorischen“ Krankheitsbild zu gestalten ist.

2. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass der TRAF6/NF- κ B-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Regulation der trainingsinduzierten Skelettmuskelplastizität und damit möglicherweise auch der trainingsinduzierten Kachexieprävention spielen könnte.

Für diese Arbeit ergaben sich daher die nachfolgend dargestellten Fragen:

1. Wie verändern sich die NF- κ B-Aktivität und die *TRAF6*-Expression in Antwort auf ein mehrwöchiges, chronisches oder ein akutes Lauftraining?

Um diese Frage zu klären, sollten die NF- κ B-Aktivität und die *Traf6*-Expression in Skelettmuskelproben von Mäusen bestimmt werden, die ein mehrwöchiges, regelmäßiges oder ein einmaliges, akutes Lauftraining absolviert hatten. Die Analyse sollte im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Training erfolgen.

2. Inwieweit ist NF- κ B wichtig für die Anpassung des Skelettmuskels an den Trainingsreiz?

Um diese Frage zu klären, sollte die NF- κ B-Aktivität mittels des Inhibitors Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) gehemmt und die Anpassung des Muskels an das Training anhand geeigneter Marker analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid (37,5:1)	Serva, Heidelberg
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Amersham Hyperfilm ECL (18 × 24 cm)</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ammoniumpyrrolidindithiocarbamat (PDTC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Autoradiography GBX developer/replenisher</i>	Carestream Health Deutschland GmbH, Kodak, Stuttgart
<i>BSA - <u>b</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumin</i>	Sigma Aldrich, Steinheim
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Gibco, UK
<i>Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)</i>	Gibco, UK
<i>Dulbecco's PBS (1x)</i>	Gibco, UK
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Corning Incorporated, Corning, USA
Eisessig (Essigsäure)	VWR International GmbH, Bruchsal
Ethanol 99,8% AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol 96% AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA-Na ₂)	Carl Roth, Karlsruhe

<i>GBX Fixer and Replenisher</i>	Kodak GmbH, Stuttgart
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Immun-Blot® PVDF Membrane</i>	Bio-Rad, München
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kodak-Fixierer	Sigma Aldrich, Steinheim
Kodak-Entwickler	Sigma Aldrich, Steinheim
Kryoboxen, Pappe	ThermoFisher Scientific, Ulm
Kryoröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg
Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht
2-Mercaptoethanol 99 %, p. a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol AnalAR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
Methylenblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Microseal® 'B' seal Seals</i>	Bio-RAD Laboratories GmbH, München
<i>Midori Green Advance</i>	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Mikroreaktionsgefäß (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht
Milchpulver, <i>Blotting grade</i> , pulv., fettarm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>M- MLV Reverse Transkriptase, RNase (H-), Point Mutant (200 u/µl)</i>	Promega GmbH, Mannheim
M-MLV RT 5x Buffer	Promega GmbH, Mannheim
<i>M-Tubes gentleMACS</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Nuclease - Free Water (50 ml)</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i> (10 to 180 kDa)	ThermoFisher Scientific, Ulm

Pefabloc [®] SC-Protease-Inhibitor	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Precellys Homogenizers</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Propan-2-ol AnalAR NORMAPUR	VWR International GmbH, Darmstadt
<i>Qiashredder</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>Random Primers</i> (20 µg)	Promega GmbH, Mannheim
<i>Restore™ Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<i>RNA-later</i> 500 ml	Ambion GmbH, Kaufungen
<i>Roti®-Load</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Semi-skirted 96-well PCR Plate</i> 0, 2 ml	Thermo Fisher Scientific, Ulm
<i>SsoFast EvaGreen Supermix</i> 5 ml	Bio-RAD Laboratories GmbH, München
Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Tris-Hydroxymethyl-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin (10x)	Sigma- Aldrich, Steinheim
Tween-20	Serva, Heidelberg
Wasser demineralisiert, nicht keimfrei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen mit Filtertop (250 ml, 550 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur-Testplatten (6 Vertiefungen)	Corning Incorporated, Corning, USA

3.1.2 Standardpuffer und Lösungen

Blockierungsreagenz: (5 % BSA):

5 mg BSA auf 100 ml mit 1x-TBS auffüllen

Blockierungsreagenz: (10 % skim milk):

20 mg Milchpulver, fettarm auf 200 ml mit 1x-PBS auffüllen

Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x: 100 ml 10x PBS + 900 ml Wasser (Roth)

Phosphate Buffered Saline with Tween (PBS-T) 1x: 100 ml 10x-PBS
900 ml Wasser (Roth) 500 µl Tween

Tris-Buffered Saline (TBS) 10x: 500 mM Tris HCl pH 7,3 (60,57 g/l)
1 M NaCl (87,66 g/l)

3.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper:

Anti-Gapdh, Kaninchen	R & D Systems, Minneapolis, USA
Anti-Iκb-α, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Nf-κb (p65), Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Pgc-1α, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Traf6, Kaninchen	Merck Millipore, Darmstadt Deutschland
Anti-Atrogin-1, Kaninchen	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
<i>Anti-skeletal muscle fast myosin heavy chain antibody (ab91506)</i>	Abcam, Cambridge, UK

Sekundäre Antikörper:

Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L) (Klon: pAk)-HRPO, MinX Hu
(Meerrettich-Peroxidase gekoppelt)

Jackson Laboratory über Dianova Vertriebs-Gesellschaft mbH, Hamburg

Ziege-anti-Maus IgG (H+L) (Klon: pAk)-HRPO, MinX Hu,Bo,Ho
(Meerrettich-Peroxidase gekoppelt)

Jackson Laboratory über Dianova Vertriebs Gesellschaft mbH, Hamburg

Esel-Anti-Ziege IgG (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt)

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

3.1.4 Primer

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

Gensymbol	Genname	NCBI Reference Sequence	Primer-Sequenz (5'-3')	Größe des Amplicons
<i>Actn3</i>	<i>Actinin alpha 3</i>	NM_013456.2	fw: CCCTCAGTTCGCAGGACATC rv: CCAGCTCCTCCTGCAGTGTC	87 bp
<i>Atf3</i>	<i>Activating transcription factor 3</i>	NM_007498.3	fw: AGGCCAGATTGAGGAGCTG rv: GGTGTCCGTCCATTCTGAGC	103 bp
<i>Cox4i1</i>	<i>Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1</i>	NM_009941.3	fw: CGCTCGTTCTGATTTGGGAG rv: GGCTTCATGTCCAGCATTTC	107 bp
<i>Cpt1b</i>	<i>Carnitine palmitoyltransferase 1b</i>	NM_009948.2	fw: GGGCAGACGCGCCCATCATT rv: GCTCGGGAATGTCCACGGC	150 bp
<i>Cxcl1</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>	NM_008176.3	fw: TTGCCTTGACCCTGAAGCTC rv: CACCAGACAGGTGCCATCAG	112 bp
<i>Cxcl5</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>	NM_009141.3	fw: GCCCTACGGTGGAAAGTCATAGC rv: AACACTGGCCGTTCTTTCCAC	158 bp
<i>Egr1</i>	<i>Early growth response 1</i>	NM_007913.5	fw: CAGCGCCTTCAATCCTCAAGG rv: TCGTTTGGCTGGGATAACTCG	128 bp
<i>Fbxo32 (Atrogin-1)</i>	<i>F-box protein 32</i>	NM_026346.3	fw: GTGAGGACCGGCTACTGTGG rv: CAATCCAGCTGCCCTTTGTC	100 bp
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	NM_001289726.1	fw: TGTGTCCGTCTGGATCTGA rv: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	150 bp
<i>Glut4 (Slc2a4)</i>	<i>Glucose transporter type 4 (Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4)</i>	NM_009204.2	fw: ATGTGTGGCTGTGCCATCTTG rv: AGCCAAATATGGCCACGATGG	94 bp
<i>Hprt</i>	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>	NM_013556.2	fw: AGTACAGCCCCAAAATGGTTAAG rv: CACAAACGTGATTCAAATCCCTG	165 bp
<i>Il-6r</i>	<i>Interleukin 6 receptor, alpha</i>	NM_010559.3	fw: CTGCCACATTCTGGTAGC rv: TGGAGGAGAGGTCGTCTTGC	129 bp
<i>Maff</i>	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)</i>	NM_010755.4	fw: GTCTCCAGCCCAGAGGTCATC rv: CAACTCGCGCTTGACCTTCAG	82 bp
<i>Murf1 (Trim63)</i>	<i>Muscle ring-finger protein-1 (Tripartite motif-containing 63)</i>	NM_001039048.2	fw: TCCTGCAGAGTGACCAAGGAG rv: GCAGCTCGCTCTTCTTCTCG	103 bp

Material und Methoden

<i>Mb</i>	<i>Myoglobin</i>	NM_001164047.1	fw: CCCTGGAGGGTTGAGCACGGT rv: AGGCCACCTGGTCTGAAGGG	105 bp
<i>Myh1</i>	<i>Myosin heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult</i>	NM_030679.1	fw: GGCTCCAGGACCTTGTGGAC rv: GCTGGATCTTGCGGAATTTG	114 bp
<i>Myh2</i>	<i>Myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult</i>	NM_001039545.2	fw: TCGTTTGCCAGTAAGGGTCTG rv: CTCGATTGCTCCTTTTCGG	113 bp
<i>Myh7</i>	<i>Myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta</i>	NM_080728.2	fw: AGCGCAATGCAGAGTCAGTG rv: GCAGCCGCAGTAGGTTCTTC	102 bp
<i>Mstn</i>	<i>Myostatin</i>	NM_010834.3	fw: AACCTTCCCAGGACCAGGAG rv: TCGCAGTCAAGCCCAAAGTC	102 bp
<i>Nr4a3</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>	NM_015743.3	fw: CAAGCCTTAGCCTGCCTGTC rv: AGCCTGTCCCTTCTCTGGT	132 bp
<i>Pdk4</i>	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4</i>	NM_013743.2	fw: GGGACCCTGGGACCACAACG rv: CCACCTAGGCTGGCGGTGGT	100 bp
<i>Ppargc1a (PGC-1a)</i>	<i>Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha</i>	NM_008904.2	fw: CGTAGGCCAGGTACGACAG rv: TTTCAGACTCCCCTTCTCG	94 bp
<i>Ppp1r3a</i>	<i>Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3A</i>	NM_080464.2	fw: TGACTTGGGAGCCAATCATCC rv: CCTGGGAAGTTATTAACCGTTGG	110 bp
<i>Sdhb</i>	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein</i>	NM_025848.3	fw: TCATGGGGACACCCTGCCGA rv: TCCACAGCATGGCAACCGCTC	128 bp
<i>skNAC</i>	<i>Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form</i>	NM_001113199.1	fw: ACAGCCTCAGGCTGAGACAG rv: CTGGGCAAAGGAACTTCAA	187 bp
<i>Smyd1</i>	<i>SET and MYND domain containing 1</i>	NM_001160127.1	fw: GCATCTTCCCAACCTGGGCCT rv: GGGCCCGGAGCTCAATCCTCAT	129 bp
<i>Tbp</i>	<i>TATA box binding protein</i>	NM_013684.3	fw: AGAGAGCCACGGACAACCTGC rv: GGGAAGCCCAACTTCTGCAC	128 bp
<i>Traf6</i>	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>	NM_001303273.1	fw: TACGGGAAGCAGTGCAAACACC rv: TTTGGGCACTTTACCGTCAGGG	178 bp
<i>Ucp3</i>	<i>Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)</i>	NM_009464.3	fw: AACCCAGGGGCTCAGAGCGT rv: GTCCGCTCCCTTGGGGGTGT	189 bp
<i>Zfp36</i>	<i>Zinc finger protein 36</i>	NM_011756.4	fw: GCCACCATGGATCTCTCTGC rv: GATTCGGTTCCTCCGTGGTC	108 bp

3.1.5 Kommerzielle Kits

Amersham ECLTM advance western blotting detection kit

GE Healthcare, Freiburg

PierceTM BCA Protein Assay Kit

Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

Qiagen GmbH, Hilden

3.1.6 Eukaryontische Zelllinien

C2C12

nichttransformierte Mäusemyoblasten,
Helen Blau, Stanford University

3.1.7 Geräte

<i>BeadBug Microtube Homogenizer</i>	Multimed Biotechnologie Kontor, Kirchheim unter Teck
<i>Canon CanoScan LiDE 210</i>	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
<i>CEP100 C-PaceEP Cell Culture EP Stimulator</i>	Ionoptix, Milton, USA
<i>Corning® LSE™ Vortex Mixer</i>	Corning Incorporated, USA
<i>DPU-414 Thermal Printer</i>	Seiko Instruments GmbH, Neu-Isenburg
Elektronische Präzisionswaage BP 610	Sartorius GmbH, Göttingen
<i>Eppendorf BioPhotometer</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Electrophoresis Power Supply Consort EV231</i>	Consort bvba, Turnhout, Belgien
<i>gentleMACS™ Dissociator</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Heizblockthermostat Model TH 21	DITABIS AG - Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim
<i>Heraeus™ Multifuge™ X1R Centrifuge</i>	Thermo Scientific, Karlsruhe
<i>iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Laboratory refrigerator, MediLine -20 °C</i>	Liebherr, Kirchdorf
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
Mikro200R Zentrifuge	Hettich Holding Beteiligungs- und Ver- waltungs GmbH, Tuttlingen
Mikrobiologischer Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Mikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mini Horizontal Gel System	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Minilys benchtop homogenizer</i>	Bertin Technologies, France

<i>Mini-PROTEAN®3 Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QUANTUM Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Rollenmischer RM5	Ingenieurbüro Cat M. Zipperer GmbH, Staufen im Breisgau
<i>Shaking water baths 1083</i>	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
<i>Sonorex TK52H</i>	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Tiefkühlschrank HERAfreeze HFU 400 T -50 °C to -86 °C	Thermo Scientific, Karlsruhe
<i>Transblot SD Semidry Transfer Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Unimax 2010, rotierender Plattformschüttler	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von C2C12-Zellen

Die Zellen wurden mit *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) mit einem Zusatz von 1 % Penicillin (100 Units/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) sowie 20 % fötalem Kälberserum (FBS) als Proliferationsmedium angezüchtet. Ab einer Dichte von 50–60 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Proliferationsmedium abgenommen und die Zellen mit vorgewärmtem sterilem PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurden sie anschließend mit 0,25 % Trypsin versetzt und fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Zur Trypsin-Hemmung wurde nachfolgend serumhaltiges Proliferationsmedium hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde bei 200 g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Sediment in Proliferationsmedium aufgenommen, resuspendiert und die Zellen weiterkultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank angezüchtet.

3.2.1.2 Induktion der myogenen Differenzierung

Nach Erreichen einer 80–90 %-igen Konfluenz in Proliferationsmedium wurden die Zellen aus mehreren Flaschen trypsiniert, vereinigt sowie zentrifugiert. Aus dem gewonnenen Sediment wurde die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen PBS suspendiert, mit Trypanblau (1:10) versetzt und die Neubauer-Zählkammer mit dieser Suspension befüllt. Von vier gezählten Großquadraten wurde der Mittelwert bestimmt und dieser mit dem Kehrwert des Kammerfaktors eines Großquadrates sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der Kammerwert betrug für das gezählte Großquadrat 10^{-4} ml und somit wurde zur Zellzahlberechnung folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung war auch eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen möglich. Während tote Zellen sich aufgrund der permeablen Membran schwarzblau färben, sind vitale Zellen in der Lage das Trypanblau auszuschließen und erscheinen hell in der mikroskopischen Darstellung.

Zur Induktion der myogenen Differenzierung wurden die Zellen anschließend in Kulturplatten mit sechs Vertiefungen überführt (10^5 Zellen/Vertiefung) und anstelle des Proliferationsmediums ein Differenzierungsmedium zur Kultivierung verwendet. Nach acht Tagen fand eine nahezu vollständige Differenzierung in Myotuben statt, welche fotografisch festgehalten wurde. Mittels eines *Western-Blot*-Verfahrens wurden dann die Konzentrationen an $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ -, TRAF6- und PGC-1 α -Proteinen analysiert.

3.2.1.3 Behandlung der Zellen mit PDTC

Zur Behandlung der differenzierten Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor PDTC wurde auf ein etabliertes Protokoll unserer Arbeitsgruppe zurückgegriffen. Dabei wurde PDTC in einer Konzentration von 50 mM in DMSO (100 %) gelöst (= Stammlösung) und anschließend in Differenzierungsmedium auf eine Konzentration von 10 mM PDTC pro Vertiefung verdünnt. Das Protokoll sah dabei pro Vertiefung wie folgt aus:

Test-Zellen: 0,6 ml 50 mM PDTC-Stammlösung + 3 ml Differenzierungsmedium

Kontroll-Zellen: a) 0,6 ml DMSO + 3 ml Differenzierungsmedium

b) 3,6 ml Differenzierungsmedium

Die Kontrollzellen wurden a) nur mit Differenzierungsmedium bzw. b) mit DMSO und Differenzierungsmedium versetzt, um eine Reaktion auf das Lösemittel DMSO von etwaigen PDTC-Wirkungen abzugrenzen.

3.2.1.4 Elektrische Pulsstimulation der Zellen (EPS)

Um das Verhalten von aus C2C12-Zellen differenzierten, kontrahierenden Muskelfasern im *in vitro*-Modell zu untersuchen, wurden diese mit kontrollierten Serien von elektrischen Impulsen behandelt. Hierfür wurde das Gerät *CEP100 C-PaceEP Cell Culture EP Stimulator* mit sechs Elektroden verwendet. Die Elektroden bestanden aus einem Platindraht, welcher direkt in das elektrisch zu stimulierende Zellmedium eingetaucht und festgeklemmt wurde. Dabei wurden die Zellen nach einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll, 24 Stunden bei 37 °Celsius mit einer Frequenz von 5 Hertz gepulst. Durch den elektrischen Impuls kontrahieren die Zellen, was stark vereinfachend als ein Modell für körperliches Training angesehen werden kann. Die jeweiligen Kontrollplatten wurden nicht gepulst. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten „sofort“, „1 Stunde“, „2 Stunden“ und „3 Stunden“ nach der letzten erfolgten Pulsstimulation lysiert. Anschließend wurde wie unter 3.2.3.2 beschrieben weiterverfahren.

3.2.2 Arbeit mit Versuchstieren

3.2.2.1 Mäusestamm

C57BL/6NCrI, C57BL/6 Mouse, Strain code 027 Charles River, Sulzfeld, Germany

3.2.2.2 Laufbandtraining

Die Erhebung von *in vivo*-Daten erfolgte an insgesamt 92 Mäusen des Inzuchtstammes C57BL/6. Diese wurden gruppenweise, zeitlich versetzt, jeweils im Alter von sechs bis sieben Wochen angeliefert. Um hormonelle bzw. zyklusbedingte Schwankungen zu vermeiden, wurden nur männliche Tiere verwendet.

Die Tiere wurden in Standard-Makrolon-Käfigen (Typ II-long-Käfigen) mit geeigneter Einstreu und Zellstoff, sowie bei Einzelhaltung zusätzlich mit einem Holzhäuschen zum Schutz, untergebracht. Der Drahtgitterdeckel beinhaltete eine Futtermulde und einen abgeteilten Flaschenhalter für 250 ml-Flaschen. Bei einer Umgebungstemperatur von 22 °C und einer Luftfeuchte von 55–65 % wurden pro Käfig meist ein bis zwei, höchstens jedoch vier Tiere gehalten. Die Tiere erhielten eine Standard-Haltungsdiät und Wasser *ad libitum*. Von 17–5 Uhr erfolgte eine automatisierte Dunkelphase, in welcher auch die Laufbandexperimente, in Anpassung an die physiologische Nachtaktivität der Tiere, absolviert wurden. Nach einer Eingewöhnungszeit von zwei Wochen wurde mit dem eigentlichen Trainingsexperiment begonnen, sodass die Tiere der „Akutgruppen“ in ihrer 8.–9. Lebenswoche bzw. die Tiere der „chronischen“ Gruppe in ihrer 8.–18. Lebenswoche in den Laufbandexperimenten eingesetzt wurden. In den ersten beiden Eingewöhnungswochen wurden die Mäuse an die Geräusche, die neue Umgebung und das Laufen auf dem Laufband gewöhnt, ohne ein Training im ei-

gentlichen Sinne zu absolvieren. Dazu wurden die Tiere zunächst an einigen Tagen für einige Minuten auf das ausgeschaltete Laufband bei 0° Steigung gesetzt. Nachdem keine „Stresssignale“ wie Fluchtversuche, „Stressputzen“ etc. bei den Tieren mehr zu erkennen waren, wurden die Tiere an den nachfolgenden Tagen für je maximal zehn Minuten auf das eingeschaltete Laufband gesetzt. Die Startgeschwindigkeit betrug dabei 5 cm/s bei 0° Steigung und wurde nach und nach in Schritten von 3 cm/s gesteigert. Die Steigung wurde nach fünf Minuten von 0° auf 15° eingestellt. Die vorher festgelegte Endgeschwindigkeit betrug 24 cm/s bei einer Endsteigung von 15°. Diese Laufbedingungen bedeuteten für die Tiere eine moderate Belastung, die im aeroben Ausdauerbereich lag. Eine Behandlung der Tiere mit Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) erfolgte intraperitoneal („Akutgruppen“) beziehungsweise oral über das Trinkwasser („chronische“ Gruppen). Bei allen Tieren wurde wöchentlich das aktuelle Gewicht ermittelt und schriftlich festgehalten. Dies diente dazu, Gewichtsunterschiede von „Läufern“ gegenüber „Nichtläufern“ sowie behandelten gegenüber unbehandelten Tieren gegebenenfalls festzustellen um dann nötigenfalls das Experiment dementsprechend abändern bzw. abbrechen zu können. Dies war jedoch zu keinem Zeitpunkt notwendig.

3.2.2.3 „Akutgruppen“

Den zehn Mäusen der jeweils sechs „Akutgruppen“ wurde zwei Stunden vor Beginn des akuten Lauftrainings intraperitoneal (i. p.) 20 mg/kg PDTC in 0,9 %iger NaCl-Lösung bzw. die gleiche Menge reine 0,9 %ige NaCl-Lösung (Kontrolltiere) injiziert. Die PDTC-Gabe konnte bei den Akutgruppen nicht wie bei der „chronischen“ Gruppe über das Trinkwasser erfolgen, da dies für das Erreichen einer *steady state*-Konzentration vier Tage vorher hätte erfolgen müssen, was wiederum durch darauffolgende kompensatorische Reaktionen zu verfälschten Akut-Trainings-Ergebnissen hätte führen können.

Die „Nichtläufer“ verweilten während des Trainings in ihren Käfigen. Die „Läufer“ absolvierten nach einem fünfminütigem *Warm-Up* von 8 cm/s bei 5° Steigung ein 60-minütiges Lauftraining bei einer Steigung von 15°, bei dem die Geschwindigkeit anfänglich jede Minute um je 3 cm/s und nach zehn Minuten (23 cm/s) einmalig um 1 cm/s auf die Endgeschwindigkeit 24 cm/s erhöht wurde. Nach dem Training wurde von den „Läufern“ ein Teil sofort mit CO₂ getötet und das Skelettmuskelgewebe präpariert (= „Proben sofort“). Der andere Teil der „Läufer-Tiere“ wurde zur Erholung zurück in die Käfige gesetzt und nach drei Stunden nach dem gleichen Verfahren präpariert und analysiert (= „Proben 3 h“). Unter den Nichtläufern wurde ebenfalls eine „Sofortgruppe“ sowie eine „3 h-Gruppe“ gebildet; das Verfahren entsprach hierbei dem oben beschriebenen Vorgehen bei den „Läufern“. Die „Proben 3 h“ wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert und die „Proben sofort“ für spätere Analysen unserer Arbeitsgruppe eingelagert.

3.2.2.4 „Chronische“ Gruppen

Aufgrund der starken Nebenwirkungen der höheren PDTC-Dosis bei den „Akutmäusen“ wurde bei den zwei „chronischen“ Gruppen à 16 Mäusen eine sehr geringe Dosis gewählt. Dies sollte gewährleisten, dass die behandelten Tiere den kompletten Versuch absolvieren konnten, ohne aufgrund von Nebenwirkungen Unregelmäßigkeiten oder gar einen Abbruch des zehnwöchigen Experiments herbeizuführen. Bei einer PDTC-Konzentration des Trinkwassers von 0,04 mg/ml und einer durchschnittlichen täglichen Trinkmenge von ca. (6-)8 ml pro Maus (Bachmanov *et al.*, 2002), ergab sich eine ungefähr aufgenommene orale Dosis von 8-12 mg/kg/d. Das Trinkwasser mit dem zugesetzten PDTC wurde drei Mal pro Woche erneuert. Die verbrauchte Trinkwassermenge wurde dabei durch Wiegen erfasst und tabellarisch festgehalten, um eine veränderte Wasseraufnahme, durch z. B. veränderten Geschmack aufgrund des PDTC's, zu verhindern. Die Firma Sigma Aldrich verweist in ihren Produkthinweisen auf die Photosensitivität des PDTCs. Zum Schutz des Inhibitors wurden die Trinkflaschen daher mit Aluminiumfolie umwickelt. Dies animierte die Tiere zum Bearbeiten der Aluminiumfolie. Um Einwirkungen auf den Metabolismus oder sogar Vergiftungen oder Ersticken der Tiere durch Aluminiumfolie zu vermeiden, wurde jeweils eine zugeschnittene Kunststoffscheibe unter die Trinkflaschen gelegt und dadurch ein Nagen unterbunden. Die Tiere absolvierten drei Trainingseinheiten pro Woche von je 60 Minuten über zehn Wochen. Dabei wurden sie in jeder Trainingseinheit langsam an die Endgeschwindigkeit (24 cm/sec, 15°) herangeführt, indem die Geschwindigkeit und Steigung schrittweise bis zur fünften Trainingswoche erhöht und dort das Endziel erreicht wurde. Danach erfolgten die Trainingseinheiten entsprechend eines Akuttrainings der „Akutgruppe“ mit jeweils 24 cm/sec bei 15° Steigung. Zwischen den drei Trainingseinheiten lag jeweils mindestens eine Erholungszeit von 48 Stunden. Nach dem letzten Training in der zehnten Trainingswoche wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt und nach 48 Stunden ebenfalls wie die anderen Tiere getötet, präpariert und analysiert. Die Wartezeit von 48 Stunden sollte es ermöglichen, die rein trainingsbedingte Skelettmuskelanpassung, ohne eine potentielle „Akut-Antwort“, zu erfassen.

3.2.2.5 Tötung und Präparation der Versuchstiere

Sowohl die Tötung als auch die Präparation wurde bei den „akuten“ und „chronischen“ Mäusen auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. Die Tötung erfolgte dabei einzeln im jeweils eigenen Käfig durch Einleiten von CO₂. Dabei wurde es vermieden, das CO₂ zu hochdosiert zu verabreichen, um Reizungen der Atemwege zu vermeiden, die die Tiere bewusst wahrnehmen hätten können, was ggf. zu Panik und unnötigem Leiden hätte führen können. Danach wurden die Tiere für die Gehirnentnahme dekapitiert und dabei gleichzeitig Blut gewonnen. Anschließend wurden der *M. gastrocnemius*, der *M. soleus*, der *M. tibialis anterior*, der *M. quadriceps* und die Adduktorenmuskeln beider Hintergliedmaßen präpariert. Die Mus-

keln der linken Hintergliedmaße wurden in *RNA/ater* verbracht und die der rechten Hintergliedmaße in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Des Weiteren wurden das Herz, das Zwerchfell (beide in *RNA/ater*), die Leber, die Lunge, das Pankreas, der gesamte Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum) und ein Stück Fettgewebe (alle in flüssigen Stickstoff) entnommen. Alle gewonnenen Proben wurden sofort auf Trockeneis zwischengelagert und anschließend in einem -80 °C -Tiefkühlschrank bis zur Probenaufbereitung aufbewahrt. Die Blutproben aus Kopf und Körperinnerem wurden zentrifugiert, das Plasma entnommen und ebenfalls in einem -80 °C -Tiefkühlschrank zwischengelagert.

Der gesamte Tierversuch fand unter Einhaltung des geltenden Tierschutzgesetzes statt (Genehmigungsnummer M9/14, Regierungspräsidium Tübingen) und wurde vom Veterinärdirektor Dr. med. vet. Franz Iglauer von der Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Eberhard Karls Universität und des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt und vor Ort überprüft.

3.2.3 Proteinchemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Muskelgewebe

Die Muskelproben wurden auf Eis aufgetaut, um eine Protein-Denaturierung zu vermeiden. Anschließend wurden sie zusammen mit je $500\text{ }\mu\text{l}$ Protein-Extraktionspuffer in je ein M-Tube/BeadBug-Gefäß überführt, in einem gentleMACS/BeadBag bei Raumtemperatur homogenisiert und dann wieder auf Eis gestellt. Danach wurde für eine Minute bei 200 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand jeweils in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses wurde zur Lysis für fünf Minuten in ein Ultraschall-Eisbad gestellt, bis die Lösung durch die Sonifikation klar erschien, und anschließend in einer Zentrifuge bei 4 °C und 13000 xg für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt das lösliche Protein, welches jeweils in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde.

Zelllysispuffer

Gelöst in 180 ml demineralisiertem, nicht keimfreien Wasser der Firma Roth:

50 mM HEPES pH 7,4	2,38 g
150 mM NaCl	1,753 g
10 mM NaF	0,0839 g
1 mM Na_3VO_4	0,366 g
5 mM EDTA	5 ml 0,2 M
Triton X 100 0,5 %	1 ml

Protein-Extraktionspuffer

Zellysispuffer	5 ml
Proteinaseinhibitor Pefabloc	10 µl

Proteinaseinhibitor Pefabloc

100 mg Pefabloc wurden in 167,8 µl demineralisiertem Wasser (Firma Roth) gelöst, dabei entstand eine Stammlösung von 2,5 mM. Diese Stammlösung wurde später im Proteinextraktionspuffer auf 5 µM verdünnt.

3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte unter Verwendung des *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Absorption wurde per Doppelbestimmung je Probe photometrisch bei 562 nm in Plastikküvetten bestimmt, wobei bei jeder Messreihe auch eine Standard-Verdünnungsreihe (mit BCA-Assay: Albumin Standard 2 mg/ml) angefertigt und als Abgleich gemessen wurde. Anschließend wurde die Proteinkonzentration über die optische Dichte, den Verdünnungsfaktor und die Referenz-Standardwert-Kurve berechnet.

3.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse wurden die jeweiligen Proteinlysate entsprechend einer Berechnung zum Erhalt von 30 µg Protein pro Geltasche mit 6,3 µl Mercaptoethanol und der entsprechenden Menge Wasser gemischt, um jede Geltasche mit einem Gesamtvolumen von 25 µl zu befüllen. Die so hergestellten Proben wurden für fünf Minuten im Heizblock bei 95 °C denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und sofort auf ein Gel von ca. 1,5 mm Dicke aufgetragen. Diese Probengemische wurden zu je 25 µl pro Geltasche aufgetragen und mittels diskontinuierlicher Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in vertikaler Richtung aufgetrennt. Dabei wurde das Puffersystem nach Laemmli, wobei Glycin als Zwitterion dient, angewendet (Laemmli, 1970). Als sogenannte Standardmuskelprobe wurde der *M. gastrocnemius* einer Maus als aufbereitete Probe in jedem Gel mitgeführt, um Abweichungen/Fehler zwischen den Gelen über den Vergleich der identischen Probe vergleichen zu können. Die Gele bestanden aus einem fünf Zentimeter breiten Trenn- und einem sich daran anschließenden ca. zwei Zentimeter breiten Sammelgel. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels variierte in Abhängigkeit zur Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 8 % und 12 %, die des Sammelgels lag bei 6 %. Bei allen Gelen wurde ein Molekulargewichtsmarker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific*) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann bei 100 V (nach zehn Minuten 130 V), 73

W und 50 mA, bis die Lauffront das Gelende bzw. die rote Protein-Markierung von 72 kDa die Hälfte des Gels erreicht hatte. Dieser Vorgang dauerte ca. eineinhalb bis zwei Stunden.

SDS-PAGE (Laemmli) für vier Gele mit einer Dicke von 1,5 mm

Zusammensetzung des Trenngels 12 %

40 % Acrylamid-Mix (37,5:1)	12 ml
TG-Puffer	10 ml
ddH ₂ O	18 ml
TEMED	60 µl
APS	160 µl

Zusammensetzung des Sammelgels 6 %

40 % Acrylamid-Mix (37,5:1)	2,4 ml
SG-Puffer	4,0 ml
ddH ₂ O	9,6 ml
TEMED	40 µl
APS	80 µl

Benötigte Stammlösungen:

- **3 M Tris-HCl (pH 8,8):**
36,342 g Tris wurden in max. 80 ml ddH₂O gelöst, dann der pH-Wert mit HCl auf pH 8,8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.
- **1M Tris-HCl (pH 6,8):**
12,114 g Tris wurden in max 80 ml ddH₂O gelöst, dann der pH-Wert mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.
- **10 % SDS:**
10 g SDS wurden in 80 ml ddH₂O gelöst, dann wurde auf 100 ml aufgefüllt.

4x Trenngel (TG)-Puffer:

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

4x Sammelgel (SG)-Puffer:

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

10x Laufpuffer / Elektrodenpuffer

0,25 M Tris	30,285 g/l
0,192 M Glycin	144,13 g/l
1 % SDS	10 g/l
pH 8,3 stimmt meist direkt, ansonsten mit Tris oder Glycin einstellen	

3.2.3.4 Immunologische Methoden

3.2.3.4.1 Western Blot

Bei der Western Blot-Analyse findet ein quantitativer und qualitativer Nachweis von spezifischen Proteinen mittels Antikörpern statt. Dazu muss das zu untersuchende Proteinlysate zunächst mittels SDS-Page (s. 3.2.3.3) aufgetrennt werden, um anschließend die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine adsorbierende Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zu transferieren.

Transfer:

Zuerst wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel elektrisch mit Hilfe einer *Semidry*-Blotapparatur auf eine PVDF-Membran der Firma Bio-Rad transferiert, welche die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet. Hierzu wurden die Gele und die Membran, welche vorher einige Sekunden in Methanol inkubiert wurde, in Blotpuffer auf einem Schüttler bei Raumtemperatur äquilibriert. Die untere Platte des *Semidry-Blotters* (Anode) wurde luftblasenfrei mit Blotpuffer angefeuchtet. Darauf wurden drei in Blotpuffer angefeuchtete Chromatographie-Papiere luftblasenfrei aufeinander geschichtet, auf welche dann zuerst die PVDF-Membran und darauf das Gel platziert wurden. Auf diese wiederum wurden drei ebenfalls in Blotpuffer getränkte Filterpapiere geschichtet und die Kathode (Deckel) aufgelegt. Der elektrische Transfer erfolgte dann bei einer Stromstärke von 1 mA pro cm², welches bei zwei Gelen mit einer Dicke von 1,5 mm ca. 165 mA (40 V, 73 W) entsprach und eine Stunde und zehn Minuten dauerte. Die Membranen wurden im Anschluss für fünf Minuten in eine Petrischale mit Ponceau S-Lösung gelegt. Anhand der rötlichen Farbbanden konnte überprüft

werden, ob die Auftrennung und der Transfer der Proteine erfolgreich waren. Für weitere Schritte wurde die Membran wieder mit Wasser entfärbt.

10x-Blotpuffer

250 mM Tris

1,92 M Glycin

Blotpuffer (1x)

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % Methanol (vor Gebrauch frisch zugegeben)

Inkubation mit Antikörpern (AK):

Die Membran wurde zuerst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in einer hochprozentigen Proteinlösung (10 % *skim milk*, bei Anti-Traf6: 5 %ige BSA-Lösung) 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem proteinspezifischen, entsprechend verdünnten, Primär-AK (verdünnt in 5 % *skim milk*) über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4 °C. Sämtliche folgenden Inkubationsschritte erfolgten dann auf einem Schüttler bei Raumtemperatur:

Waschen	3 x 10 Minuten
Sekundär-AK (verdünnt in 5 % <i>skim milk</i>)	1–2 Stunden
Waschen	3 x 10 Minuten

(Das Waschen erfolgte mittels *PBS-T*)

Stripping:

Die detektierbaren Banden von TRAF6 und PGC-1 α befanden sich auf der Membran in ähnlicher Höhe und beide wurden mit dem Sekundär-Antikörper (AK) „Ziege-Anti-Kaninchen IgG“ inkubiert. Deswegen wurden zur mehrmaligen Verwendung der Membran und zur Unterscheidung dieser Banden die AK nach der Detektion von den Proteinen wieder abgetrennt („*stripping*“). Hierzu wurde die Membran eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* inkubiert. Anschließend wurde drei mal zehn Minuten mit *PBS* ohne *Tween* gewaschen.

Antikörper-Konzentrationen:

Primär-Antikörper:

Anti-I κ B- α , Kaninchen	1 : 600
Anti-GAPDH, Maus	1 : 5.000
Anti-PGC-1 α , Kaninchen	1 : 500
Anti-Traf6, Kaninchen	1 : 1.500
Anti-Atrogin-1, Kaninchen	1 : 1.000
Anti-MYHC fast, Kaninchen	1 : 800

Sekundärantikörper:

Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt	1 : 20.000
Ziege-Anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt	1 : 20.000

Detektion:

Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit Hilfe eines enzymgekoppelten zweiten Antikörpers, wobei das Enzym eine geeignete Nachweisreaktion katalysierte.

3-Aminophthalsäure und Stickstoff entstehen dadurch, dass die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid katalysiert. Bei dieser katalysierten Oxidation entsteht Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm (Lumineszenz). Diese Reaktion wurde auf der Membran durch den *Amersham ECLTM Advance Western Blotting Detection Kit* der Firma GE Healthcare nach Angaben des Herstellers herbeigeführt. Die Lichtemission konnte durch das Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden, wobei die Belichtungsdauer je nach Signalstärke zwischen 15 Sekunden und 30 Minuten betrug.

Densitometrische Quantifizierung:

Nach dem Einscannen des Röntgenfilms wurde unter Verwendung des Programms *Corel PHOTO-PAINT X5* eine densitometrische Quantifizierung der *Western Blots* durchgeführt, um die unterschiedliche Intensität der Banden festzustellen. Dafür wurden die jeweiligen Banden in Graustufen dargestellt und anschließend, nach Vergrößerung des Bildes, mithilfe des Lassowerkzeuges die Banden rechteckig gleichmäßig eng umfahren. Durch die Histogramm-Funktion von *Corel PHOTO-PAINT X5* konnte ein Mittelwert von Helligkeit und Pixelzahl der jeweils umfahrenen Fläche erhoben werden. Die Ergebnisse wurden in Beziehung zur Signalintensität in der entsprechenden Spur nach Inkubation mit einem GAPDH-

Antikörper gesetzt. GAPDH wurde als Referenz ausgewählt, da es *ubiquitär* und in weitgehend konstanter Menge im Skelettmuskel vorkommt. Es wird erwartet, dass GAPDH unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen immer in konstanter Konzentration vorhanden ist. Nach der Normalisierung in Bezug zu GAPDH wurden die Ergebnisse als relative Proteinmengen im Vergleich zum Mittel der unbehandelten Nichtläufer dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte nach der Berechnung von Taylor und Posch (Übersicht bei Taylor und Posch, 2014). Bei der statistischen Auswertung wurden die log-transformierten Expressionswerte über eine einfaktorische Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) auf signifikante Gruppenunterschiede überprüft. War dies der Fall, wurde der Tukey-Kramer-Test als *Post-Hoc*-Test verwendet, um zu ermitteln welche Gruppen signifikante Unterschiede zueinander aufwiesen.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA

Um eine Degradation von RNA durch Ribonukleasen (RNAsen) zu vermeiden, wurden mehrere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen. Da RNAsen ubiquitär vorkommen, wurden bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen und nur sterile, autoklavierte Pipettenspitzen und Plastikgefäße verwendet.

3.2.4.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe

Die Isolierung der gesamtzellulären RNA erfolgte mit dem *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* nach dem Herstellerprotokoll von Qiagen. Das Protokoll wurde lediglich um einen Durchlauf durch einen *Qiashredder* vor dem Auftragen auf die *Kit*-Säulen ergänzt.

3.2.4.3 Messung der RNA-Konzentration

Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wurde photometrisch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Messung der Absorption, für welche die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind, erfolgte in Kunststoffküvetten. Nukleasefreies Wasser diente dabei als Referenzwert. Um die Reinheit der Nukleinsäuren zu überprüfen, wurde das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm zu denen bei 280 nm, sowie von 230 nm zu 260 nm bestimmt. Dabei wurden solche Proben für weitere Analysen verwendet, bei denen der Quotient 260/280 zwischen 1,8 und 2,0 und der von 230/260 zwischen 2,0 und 2,2 lag.

Vor der Synthese von *complementary DNA* (cDNA) wurde die RNA-Qualität durch eine elektrophoretische Auftrennung im nativen Agarosegel kontrolliert. Dabei sollte ausschließ-

lich die RNA-Qualität und nicht die exakte Größe der RNA bestimmt werden. Dazu wurden 0,25 g Agarose in 25 ml 1x-Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer eingewogen, in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung aufgeköcht und auf ca. 60 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 2,5 µl *Midori Green* wurde das Gel in einen Gelschlitten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Später wurde das erkaltete Gel in die Elektrophoreskammer gelegt, die Kammer mit 1x-TAE-Puffer gefüllt und die Probe (RNA-Lösung) mit 6x-Ladepuffer versetzt (5 µl RNA (100 ng/µl) + 1 µl 6x-Ladepuffer). Die so hergestellte Probe wurde in die Geltasche pipettiert und das Gel bei 100 V ca. 30 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

1x-TAE-Puffer

40 mM Tris-Azetat

1 mM EDTA

TAE-Stammlösung (50x)

Für 1 Liter TAE (50x):

Tris-Base 242 g

Eisessig 57,1 ml

0,5 M EDTA (pH 8,0) 100 ml

(Um eine 0,5 M EDTA-Lösung herzustellen werden 186,1 g EDTA-Na₂ in 800 ml destilliertem Wasser eingewogen und der pH mit 10 M NaOH auf 8,0 eingestellt. Anschließend wird dieser Ansatz auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.)

-> **1:50 verdünnen: 1x-TAE**

3.2.4.4 Synthese von cDNA

In einer Reversen Transkription synthetisiert eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (= Reverse Transkriptase) DNA-Kopien eines RNA-Stranges, die sogenannte cDNA.

Für diese Reaktion wurden 10 µl der isolierten RNA (500 ng) mit 0,5 µl *Random Hexamer Primern* und 3,5 µl nukleasefreiem Wasser versetzt und fünf Minuten bei 70° C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen, und anschließend auf Eis gestellt, um diesen Zustand aufrecht zu erhalten. Anschließend wurde folgender Mix pro Probe zugegeben:

5 µl M-MLV RT 5x-Buffer

1,25 µl dNTPs

3,75 µl nukleasefreies Wasser

1 µl MULV

Die Synthese erfolgte dann mittels unterschiedlich temperierter Inkubationsschritte:

10 Minuten 25 °C (*Primer-Annealing*)

60 Minuten 50 °C (Synthese am Temperatur-Optimum des Enzyms *M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant*)

15 Minuten 70 °C (Enzymaktivierung)

Die gewonnene cDNA wurde vor dem Einsatz als *template* in der *Realtime-PCR* mit nukleasefreiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und dann bei -20 °C zwischengelagert.

3.2.4.5 Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Grundlage der quantitativen *Real time-PCR* besteht auf der Detektion eines proportional während der Amplifikation eines PCR-Produktes entstehenden Fluoreszenzsignals (Livak und Schmittgen, 2001). Im Gegensatz zur Endpunkt-Detektion bei einer konventionellen PCR wird bei diesem Verfahren die während eines jeden Zyklus emittierte Fluoreszenz als ein Parameter nachgewiesen, der die Template-Vermehrung während der exponentiellen Phase der PCR widerspiegelt (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Dies ermöglicht einerseits die Quantifizierung der Matrizenmenge (= absolute Quantifizierung) in einer Reaktion und andererseits die Messung von Unterschieden in der Menge einer Matrize zwischen verschiedenen Proben (= relative Quantifizierung). Zur relativen Quantifizierung wurde zur Detektion des Fluoreszenzsignals der unspezifisch in dsDNA interkalierende, fluoreszierende Farbstoff *SYBR Green 1* eingesetzt.

Der Reaktionsansatz pro Vertiefung einer Kulturplatte mit 96 Vertiefungen sah wie folgt aus:

5 µl *cDNA*

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

10 µl *SsoFast EvaGreen supermix* (2 x)

Dabei wurde folgendes Zeit-Temperatur-Protokoll angewandt:

95 °C für 30 Sekunden (Enzymaktivierung)

40 Zyklen à

95 °C für 5 Sekunden (Denaturierung)

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

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats zur Spezifitätsüberprüfung der PCR-Produkte (65–95 °C).

Als *threshold cycle* (Ct) gilt der Zyklus, bei dem erstmals die Mindestmenge an amplifizierten Produkten vorhanden ist, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Über diesen Ct-Wert konnten die cDNA-Mengen der verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. So war

z. B. bei einem kleinen Ct-Wert eine höhere Menge der Ziel-DNA erhalten, bei einem großen Ct-Wert war die cDNA-Kopienanzahl hingegen gering. Bei der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) werden als Kontrolle Referenzgene (=Housekeeping-Gene) mitamplifiziert. Diese Referenzgene sollten *ubiquitär* vorkommen und weitgehend konstant, ohne experimentellen Einfluss, exprimiert werden. Um somit auf gleiche Ausgangsmengen an cDNA zu normalisieren, wurden die Ct-Werte gegen das geometrische Mittel der drei Referenzgene TBP (*tata box binding protein*), GAPDH und HPRT (*hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase*) normalisiert. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

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

Anschließend erfolgte die Ermittlung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Wertes für jede Probe anhand dieser Formel (expression Ratio): $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Die RNA-Quantifizierung und -Auswertung erfolgte mit Hilfe des *iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System* von Bio-Rad Laboratories GmbH und nach der Berechnungsmethode von Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Analyseprogrammes JMP 11.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Zur Ermittlung signifikanter Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen wurden die log-transformierten Expressionswerte über eine einfaktorische Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) und anschließendem Tukey-Kramer-Test analysiert. Für die relative Quantifizierung der Expressionsunterschiede wurde die Analysesoftware REST-XL (REST = Relative Expression Software Tool, Pfaffl *et al.*, 2002) verwendet. Für alle Ergebnisse wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $P < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 *In vitro*-Vorversuch

4.1.1 Einfluss einer EPS-Stimulation und einer PDTC-Behandlung auf C2C12-Zellen

Um die Antikörper zu testen, die in der *in vivo*-Studie verwendet werden sollten und um außerdem präliminäre Daten zu einer möglichen Regulation der entsprechenden Gene durch PDTC und/oder körperliches Training zu erhalten, wurde ein in der Arbeitsgruppe gut etabliertes *in vitro*-Modellsystem verwendet. Dieses bestand aus murinen Myoblasten der nicht-transformierten Zelllinie C2C12, welche *in vitro* zur Differenzierung und zur Kontraktion gebracht werden können.

Nach acht Tagen Differenzierung wurde zunächst ein Teil der C2C12-Zellen, nach einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Modell, mit 10 μ M PDTC behandelt (s. 3.2.1.3). Kontrollzellen wurden stattdessen entweder mit einer entsprechenden Menge DMSO, welches als Lösungsmittel für das PDTC diente, oder mit Differenzierungsmedium alleine versetzt, um einen PDTC-Effekt von etwaigen DMSO-/ oder Differenzierungsmedium-Wirkungen abzugrenzen.

Später wurden die differenzierten C2C12-Zellen kontrollierten Serien von elektrischen Impulsen ausgesetzt, was koordinierte Kontraktionen induzierte und als ein Modell für Ausdauertraining angesehen werden kann (s. 3.2.1.4). Die Zellen wurden anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der EPS-Stimulation entnommen. Die Zeitpunkte wurden wie folgt gewählt: Zeitpunkt „sofort“, „1 h“, „2 h“ und „3 h“.

Die Zellen wurden morphologisch untersucht, wobei sich zu allen Zeitpunkten ein ähnliches Bild der Myotuben darstellte.

Die Zellen, welche mit PDTC behandelt worden waren, zeigten nach der Stimulation mit elektrischen Pulsen nur noch wenige morphologisch sichtbare Myotuben (Abb. 6 A, D). Bei den Kontrollzellen hingegen, welche nur mit Differenzierungsmedium oder mit Differenzierungsmedium plus DMSO behandelt worden waren, waren deutlich differenzierte Myotuben sichtbar (Abb. 6 B, C, E, F). Die EPS-Stimulation führte bei den nur mit Differenzierungsmedium oder mit Differenzierungsmedium plus DMSO behandelten Kontrollzellen tendenziell zu stärker ausgeprägten Myotuben (Abb. 6 B, C) als bei den Myotuben der Kontrollzellen ohne elektrische Stimulation (Abb. 6 E, F).

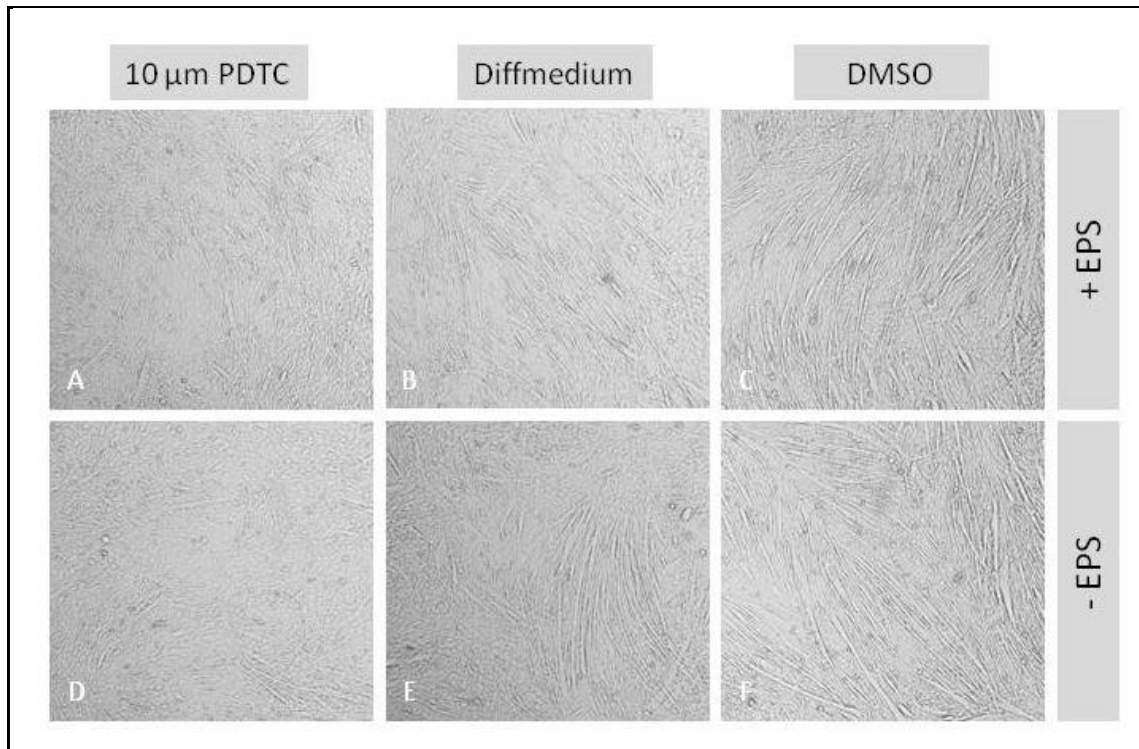


Abb. 6: Einfluss einer EPS-Stimulation und PDTC-Gabe auf C2C12-Zellen: Die Zellen wurden...

A: ... mit 10 µM PDTC behandelt und EPS-stimuliert.

B: ... mit Differenzierungsmedium behandelt und EPS-stimuliert.

C: ... mit Differenzierungsmedium sowie DMSO behandelt und EPS-stimuliert.

D: ... mit 10 µM PDTC behandelt und nicht mit EPS stimuliert.

E: ... mit Differenzierungsmedium behandelt und nicht mit EPS stimuliert.

F: ... mit Differenzierungsmedium sowie DMSO behandelt und nicht elektrisch stimuliert.

Man beachte, dass sich eine PDTC-Gabe tendenziell negativ auf die Entwicklung der Muskelfasern, im Vergleich zu den unbehandelten Muskelfasern, auswirkt.

Zusätzlich zur morphologischen Analyse der Zellen wurden zytosolische Proteinlysate aus den Zellen gewonnen und mittels *Western Blot* untersucht.

Hierbei wurden insbesondere die Konzentration der Proteine NF-κB, PGC-1α, IκB-α und TRAF6 analysiert (Abb. 7). Dabei wurden zwei verschiedene TRAF6-Antikörper der Firmen *Merck Millipore* und *Santa Cruz Biotechnology* getestet. Es wurde in den weiteren Versuchen dann ausschließlich der Antikörper der Firma *Santa Cruz Biotechnology* verwendet.

Abb. 7 zeigt einen repräsentativen *Western Blot*. Alle Proteine waren mit Hilfe der verwendeten Antikörper nachweisbar, jedoch waren keine Effekte der PDTC-Behandlung oder der EPS-Stimulation auf die entsprechenden Proteinkonzentrationen zu beobachten.

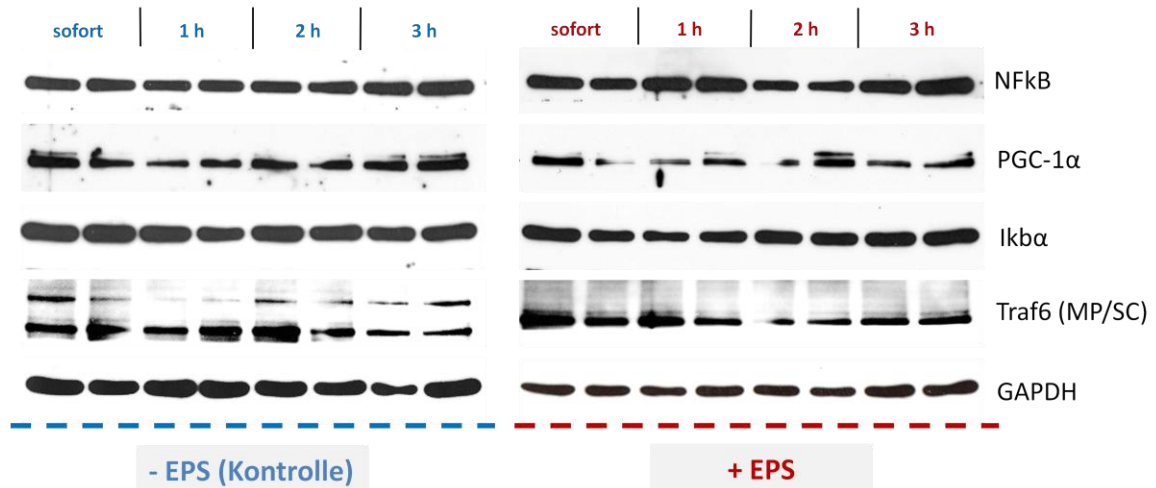
Experiment 1: 10 μ M PDTC

Abb. 7: Western Blot-Analyse der PDTC-behandelten und z. T. zusätzlich EPS-stimulierten Zellen

Die beiden Gele wurden unabhängig voneinander geblottet und die Röntgenfilme der Membranen unterschiedlich lange belichtet (links etwas länger als rechts). Aufgetragen wurden jeweils zwei unabhängige Proben, die sich jeweils aus einer Kombination von EPS-Stimulierung bzw. keiner EPS-Stimulierung und den verschiedenen Zeitpunkten zusammensetzten (kein EPS-sofort, EPS-sofort, kein EPS-1 h, EPS-1 h usw.). Je Spur wurden 30 μ g des jeweiligen Proteinlysats auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und per Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde der Nachweis des Referenzproteins GAPDH durchgeführt.

4.2 *In vivo*-Versuche am Mausmodell

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war es, inwiefern eine NF- κ B-Hemmung die Anpassung des murinen Skelettmuskels an ein Laufbandtraining beeinflusst. Hierbei wurden insbesondere die Effekte auf den murinen *M. tibialis anterior* untersucht, da dies einer der Muskeln ist zudem, neben zwei anderen Muskeln, in Bezug auf Trainingsanpassungen der Maus die meisten Daten in der Literatur zu finden sind. Die anderen gewonnenen Muskelproben werden in weiteren Projekten der Arbeitsgruppe Munz analysiert.

Dazu wurden die Mäuse, wie in 3.2.2 beschrieben, unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, wobei untersucht wurde, ob und auf welche Art Muskelanpassungen erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der Einflüsse auf den *M. tibialis anterior* auf Proteinebene die Konzentration der Faktoren I κ B- α , PGC1- α und TRAF6 untersucht. Zudem wurde auf RNA-Ebene die Expression verschiedener Gene analysiert, welche für Skelett-

muskel-Strukturproteine, mitochondriale und metabolische Marker sowie verschiedene entzündungsassoziierte Proteine kodieren.

Auf Protein- und RNA-Ebene wurden nach einer einmaligen „akuten“ und nach mehreren, sich über einen längeren Zeitraum wiederholenden „chronischen“ Trainingseinheiten Untersuchungen angestellt, jeweils mit und ohne Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC-Behandlung. Es wurden somit sowohl nach „chronischem“ als auch nach „akutem“ Training insgesamt vier verschiedene Tiergruppen untersucht:

Gruppe 1: Mäuse ohne Training und ohne Medikation (*sedentary mice (sed), control (ctrl.)*)

Gruppe 2: Mäuse mit Training und ohne Medikation (*exercise (ex), ctrl.*)

Gruppe 3: Mäuse ohne Training und mit PDTC-Gabe (*sed, PDTC*)

Gruppe 4: Mäuse mit Training und mit PDTC-Gabe (*ex, PDTC*)

4.2.1 Verhalten und makroskopischer Phänotyp der „chronischen“ Tiere im Experiment

Die in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten männlichen Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J wurden im Alter von sechs bis sieben Wochen in den Versuchen eingesetzt.

Das Anfangsgewicht der Tiere lag im Durchschnitt bei 25 g, das Endgewicht im Durchschnitt bei 32g. Die Futteraufnahme verlief bei allen Tieren konstant. Bei den PDTC-unbehandelten Tieren verlief die Gewichtsentwicklung insgesamt homogen. Das Gewicht der „Läufer“ war im Durchschnitt, wenn auch nicht signifikant, geringer als das der „Nichtläufer“. Interessanterweise waren bei den Tieren mit PDTC-Medikation stärkere Schwankungen der Gewichtsentwicklung zu beobachten und es konnte kein klarer Gewichtsunterschied zwischen trainierenden und nicht trainierenden Tieren festgestellt werden. Die starke Gewichtsschwankung zweier PDTC-behandelter Mäuse in der achten Trainingswoche ist auf einen Wassermangel, aufgrund einer ausgelaufenen Trinkflasche, zurückzuführen (s. Abb. 8).

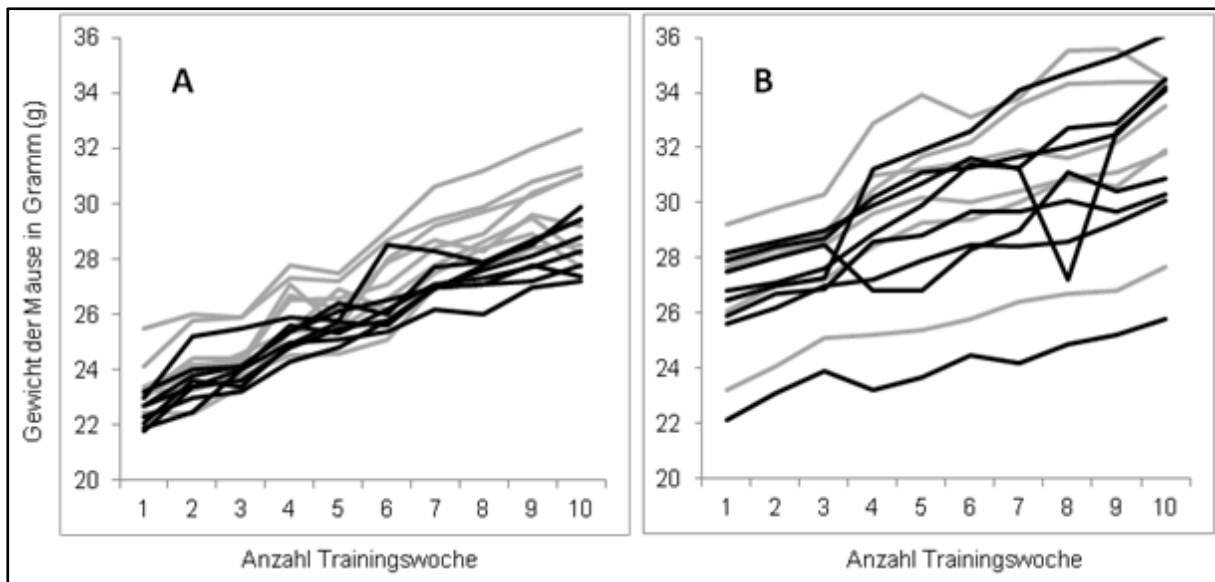


Abb. 8: Der Gewichtsverlauf der trainierten (schwarz) und untrainierten (grau) Tiere ohne (A) und mit (B) PDTC-Behandlung

Die Tiere der „chronischen“ Gruppe wurden in vier Käfigen von je vier Tieren und, nach Anraten des Tierschutzbeauftragten, in acht Käfigen mit je zwei Tieren gehalten. Von den Vierer-Gruppen wurden zwei aufgrund von leichten Revierkämpfen als Vorsichtsmaße getrennt. Von den Zweier-Gruppen wurden zwei Gruppen aufgrund intensiver Rankämpfe getrennt, wobei in zwei weiteren „Nichtläufer“-Zweier-Gruppen ein Todesfall aufgrund solcher Rivalitäten auftrat. Interessanterweise waren insgesamt sowohl bei den „chronischen“ als auch bei den „Akutmäusen“ seltener und weniger intensive Revierkämpfe bei den Vierer-Käfigen zu beobachten als bei den von Anfang an nur mit zwei Tieren besetzten Käfigen (s. u.). Der Rest der Tiere zeigte kein aggressives Verhalten und deutlich weniger Stresssymptome wie Flucht- und Sprungversuche, beim Handling als die „Akutmäuse“, welche von Anfang an allein bzw. zu zweit in einem Käfig gehalten wurden.

Die „chronischen“ Tiere zeigten auf dem Laufband eine große Laufbereitschaft und Lauffreude. Eine andauernde Laufunwilligkeit, wie sie z. B. in Brooks *et al.* (2008) oder Rosa *et al.* (2005) beschrieben wurde, war nicht zu beobachten. Auf die Stromdurchflutung der Sitzfläche am Ende eines jeden Laufbandes wurde von vornherein verzichtet. Teilweise mussten einzelne Tiere durch Antippen mit einem Papierstreifen zum Weiterlaufen animiert werden. Kein Tier zeigte während der Laufeinheiten Stresssignale wie ständiges Putzen o. ä..

4.2.2 Anpassung des Skelettmuskels an ein mehrwöchiges Lauftraining

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Effekte von „chronischem“ Training sowie einer PDTC-Gabe auf den *M. tibialis anterior* sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene untersucht.

4.2.2.1 Überprüfung der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC anhand der Konzentration des I κ B- α -Proteins

Um den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu hemmen, wurden die C57BL/6-Mäuse der entsprechenden Untersuchungsgruppen über die gesamte Trainingsperiode hinweg mit PDTC als Bestandteil des Trinkwassers behandelt (s. 3.2.2.4). Insgesamt zeigten sich zu keinem Zeitpunkt Auswirkungen der PDTC-Applikation auf das Verhalten oder die Aktivität der behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Behandlung wurde zunächst die I κ B- α -Konzentration im Skelettmuskelgewebe der Mäuse gemessen: NF- κ B ist im inaktiven Zustand an das inhibitorische Protein I κ B- α gebunden, welches den Transport in den Zellkern und die dortige DNA-Bindung verhindert (Mourkioti und Rosenthal, 2008). Da I κ B- α degradiert, wenn NF- κ B aktiviert wird, diente die I κ B- α -Konzentration als ein direktes, invers korrelierendes Maß für die NF- κ B-Aktivität.

Dazu wurden aus dem *M. tibialis anterior* Proteinlysate (s. 3.2.3.1) gewonnen, welche mittels *Western Blot*-Verfahren (s. 3.2.3.4.1) auf die Konzentration an I κ B- α hin untersucht wurden.

Abb. 9 veranschaulicht die deutlich höheren I κ B- α -Konzentrationen im Muskelgewebe der PDTC-behandelten Tiere. Dies lässt auf eine erfolgreiche Hemmung des NF- κ B durch PDTC schließen. Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten Tieren konnten dagegen nicht festgestellt werden.

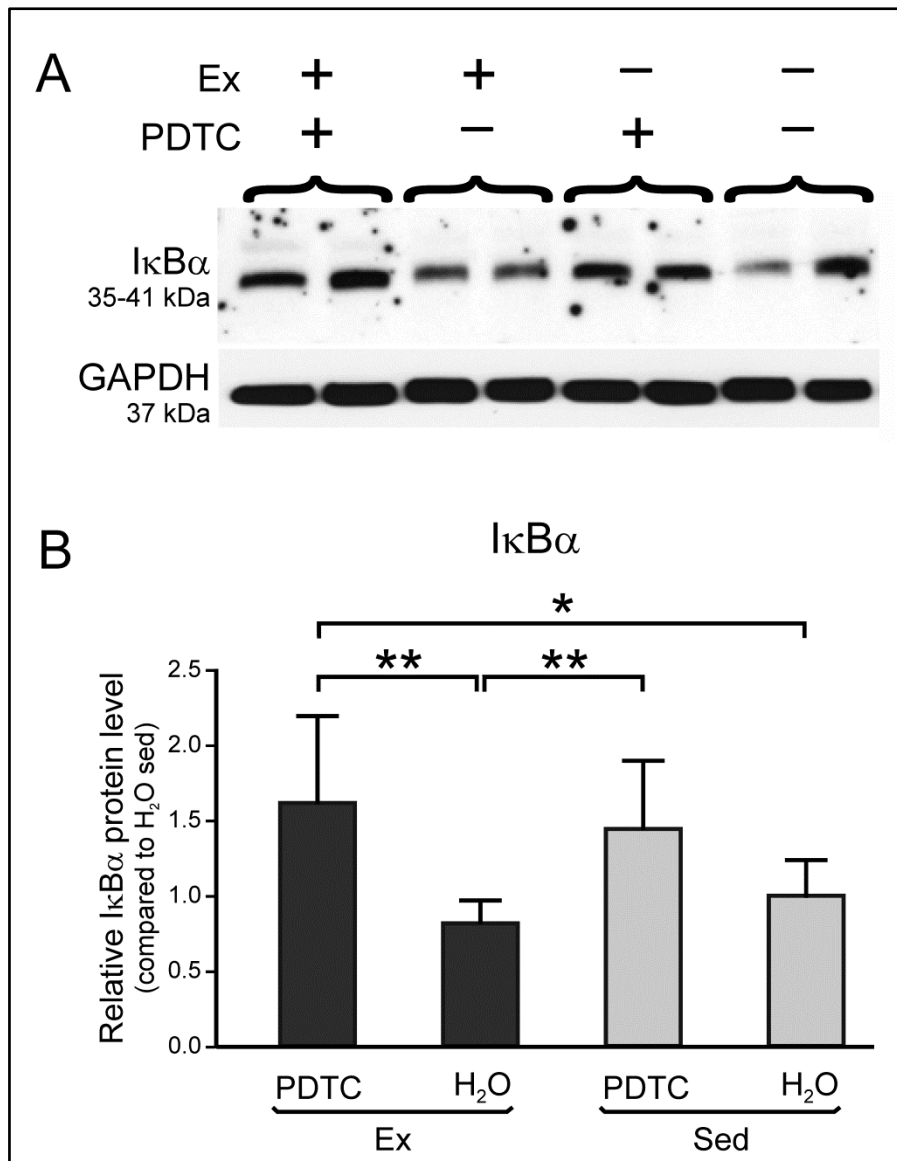


Abb. 9 Repräsentative *Western-Blot*-Analyse der IκB-α-Proteinkonzentrationen im *M. tibialis anterior* der „chronischen“ Mäuse nach NF-κB-Hemmung

(A) Es wurden pro Gel jeweils Proteinlysate aus allen vier Gruppen verglichen, sodass jeweils folgende Kombinationen auf dem Gel vorzufinden waren: 2x Training (ex)/PDTC, 2x Training/H₂O, 2x Nichtläufer (sed)/PDTC, 2x Nichtläufer/H₂O. Die Abbildung zeigt für IκB-α spezifische Banden bei 35–41 kDa. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde der Nachweis des Referenzproteins GAPDH durchgeführt.

Man beachte die deutlich stärker ausgeprägten IκB-α-spezifischen Banden bei den PDTC-behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

(B) Zur Veranschaulichung wurde dieser Versuch mittels densitometrischer Methoden quantifiziert. Die Werte wurden auf GAPDH normiert. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SD dargestellt (n = 8, * = p < 0,05, ** = p < 0,01).

4.2.2.2 Einfluss der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC und des körperlichen Trainings auf die PGC-1 α -Proteinkonzentration im Skelettmuskel

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha (PGC-1 α) ist in der Literatur häufig als sogenannter „Trainingsmarker“ aufgeführt. Die PGC-1 α -Konzentration ist bei Ausdauertraining erhöht und das Protein steuert indirekt über andere Transkriptionsfaktoren den muskulären Metabolismus und die mitochondriale Biogenese (Li *et al.*, 2011; Übersicht bei Wang und Pessin, 2013).

Die Auswirkungen der Hemmung der NF- κ B-Aktivität und des körperlichen Trainings auf den PGC-1 α -Gehalt der Proteinlysate wurde mithilfe einer *Western Blot*-Analyse, unter Zuhilfenahme eines spezifischen polyklonalen Anti-PGC-1 α -Antikörpers, untersucht.

Der in Abb. 10 A gezeigte *Western Blot* scheint anzudeuten, dass die PGC-1 α -Proteinkonzentration bei den „Läufern“ gegenüber den „Nichtläufern“ erhöht ist. Die statistische Auswertung dieses *Blots* konnte dies jedoch nicht bestätigen (Abb. 10 B).

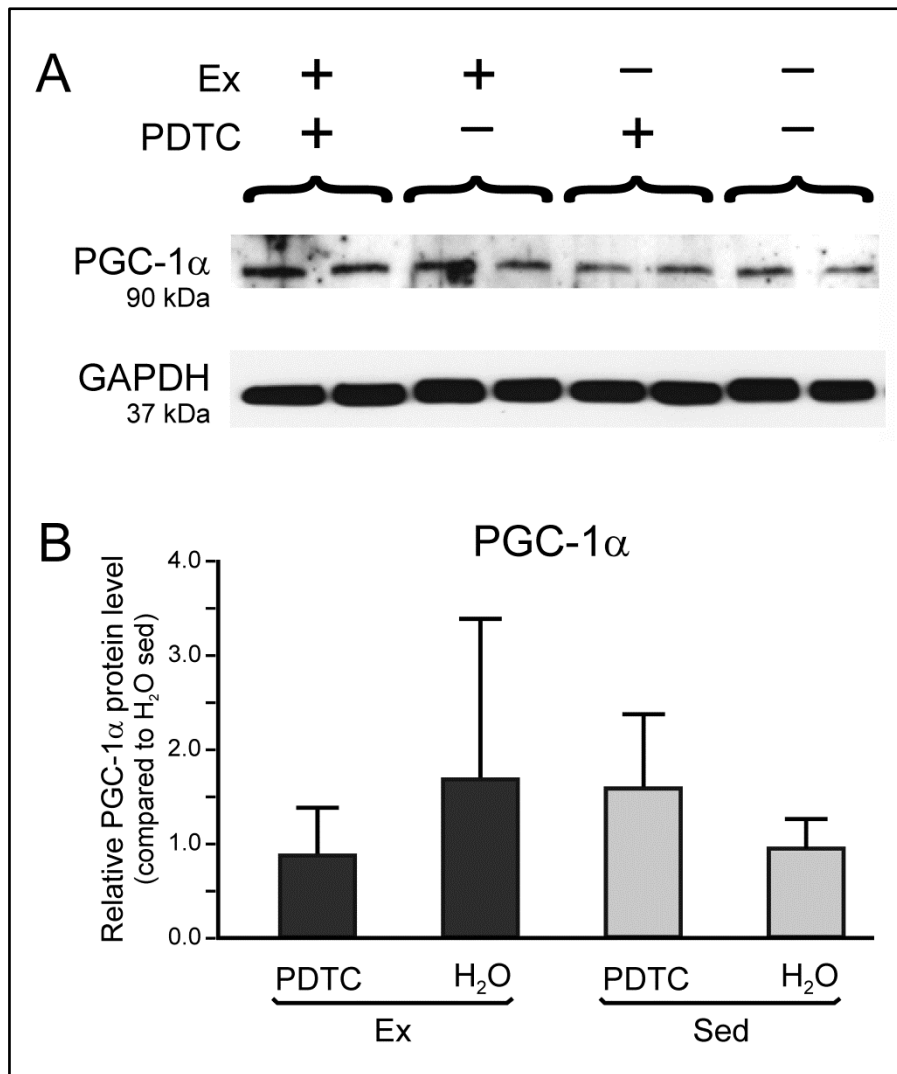


Abb. 10: Repräsentative *Western-Blot*-Analyse der PGC-1α-Proteinkonzentrationen im *M. tibialis anterior* der „chronischen“ Mäuse nach NF-κB-Hemmung

(A) Dieselbe Membran wie in Abb. 9 wurde, wie unter 3.2.3.4.1 beschrieben, gewaschen und mit einem Anti-PGC-1α-Antikörper inkubiert. Zur Detektion des Signals war eine Belichtungsdauer von 15 Minuten notwendig. Die Banden des PGC-1α zeigten sich bei 90 kDa.

(B) Zur Veranschaulichung wurde dieser Versuch mittels densitometrischer Methoden quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SD dargestellt (n = 8).

4.2.2.3 Expression des *Traf6*-Gens nach NF- κ B-Hemmung durch PDTC und körperlichem Training auf Protein- und RNA-Ebene

Expression von TRAF6 auf Proteinebene

Das Adapterprotein *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6) ist an Rezeptoren des ILR-, des TLR- und am TNF-R-Typs an der Signaltransduktion beteiligt. Da es dabei auch in die Aktivierung von NF- κ B involviert ist (Moynagh, 2005; Bradley und Pober, 2001) und da frühere Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf gaben, dass das *Traf6*-Gen in Skelettmuskelzellen durch NF- κ B reguliert wird (Mueck *et al.*, 2011), wurde die Expression dieses Gens nach Hemmung von NF- κ B durch PDTC analysiert.

Wie Abb. 11 zeigt, unterlag die Expression des *Traf6*-Gens jedoch im Skelettmuskelgewebe der untersuchten Tiere großen interindividuellen Schwankungen. Dadurch konnte auch nach densitometrischer Auswertung (nicht gezeigt), aufgrund der großen Standardabweichung, keine abschließende Aussage zu potentiellen Auswirkungen der NF- κ B-Hemmung und/oder des Lauftrainings auf die Expression dieses Gens auf Proteinebene gemacht werden.

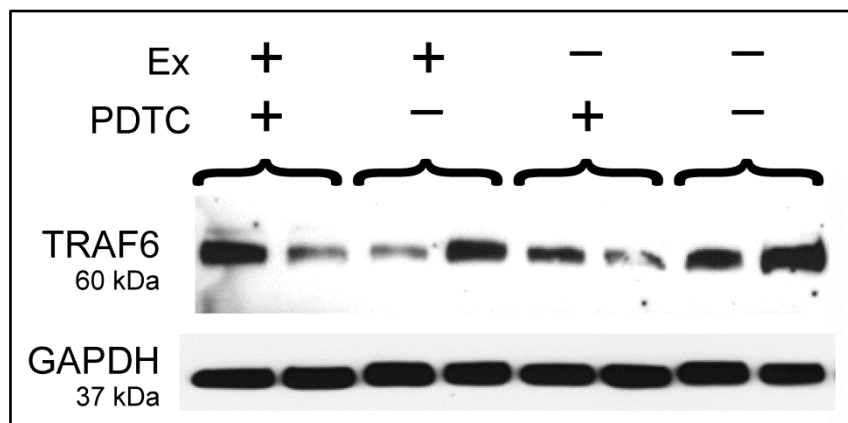


Abb. 11: Repräsentative *Western-Blot*-Analyse der TRAF6-Proteinkonzentrationen im *M. tibialis anterior* nach NF- κ B-Hemmung und/oder Lauftraining

Dieselbe Membran wie in Abb. 9 und 10 wurde nach mehreren Waschvorgängen (s. 3.2.3.4.1) und einem sogenannten *Stripping* der Membran mit einem Anti-TRAF6-Antikörper inkubiert. Zur Detektion des Signals war eine Belichtungsdauer von fünf Minuten notwendig. Die TRAF6-spezifischen Banden zeigten sich bei 60 kDa.

Expression des *Traf6*-Gens auf RNA-Ebene nach Lauftraining und NF- κ B-Hemmung

Die Expression des *Traf6*-Gens wurde auch auf RNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde die aus dem *M. tibialis anterior* gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.4.4) und diese anschließend in einer qPCR eingesetzt (s. 3.2.4.5).

Auch bei den Messungen auf RNA-Ebene zeigte das Expressionsmuster von *Traf6* weder Veränderungen in Antwort auf ein Ausdauertraining noch auf die Gabe des NF- κ B-Inhibitors PDTC (s. Abb. 12).

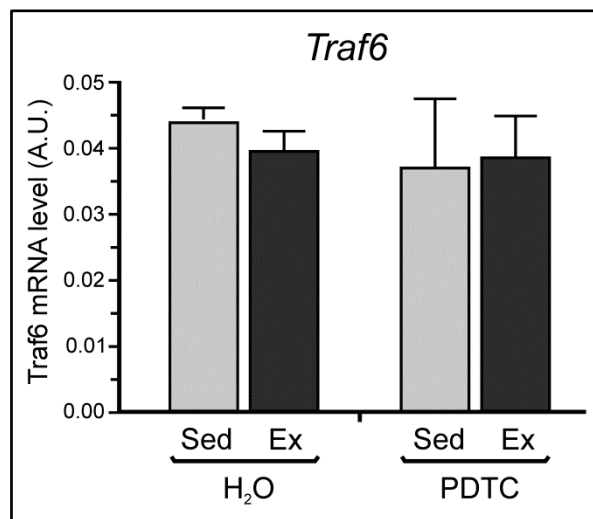


Abb. 12: Einfluss von Lauftraining und/oder NF- κ B-Hemmung auf die *Traf6* mRNA-Expression im *M. tibialis anterior*

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD von untrainierten Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und Mäusen nach 10-wöchigem Laufbandtraining (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

4.2.2.4 Auswirkungen einer NF- κ B-Hemmung durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression metabolischer und mitochondrialer Marker

Um Auswirkungen von Training und/oder Behandlung mit dem NF κ B-Inhibitor PDTC auf den murinen Skelettmuskel-Metabolismus sowie die mitochondrialen Marker zu untersuchen, wurden in der Literatur etablierte metabolische und mitochondriale Marker analysiert.

Succinate dehydrogenase complex subunit D (SDHD) oxidiert in seiner Funktion als Schlüsselenzym im Zitratzyklus Succinat zu Fumarat. Zudem ist dieses Enzym, als ein Teil der Atmungskette, in den Mitochondrien lokalisiert (Rutter *et al.*, 2010).

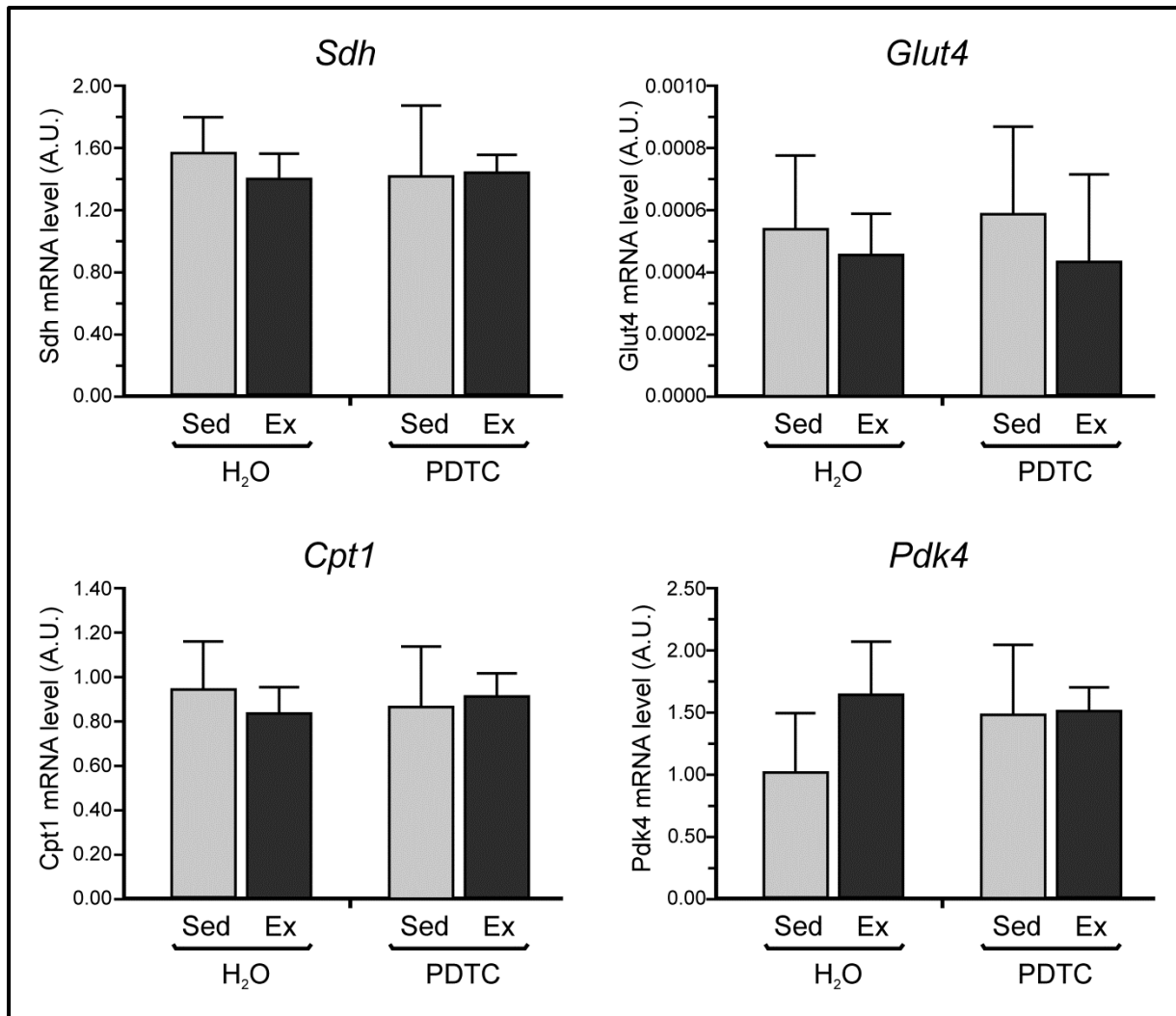


Abb. 13: Einfluss von Lauftraining und/oder NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression von *Sdh*, *Glut4*, *Pdk4* und *Cpt1* im *M. tibialis anterior*

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD von untrainierten Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und Mäusen nach 10-wöchigem Laufbandtraining (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

Glucose transporter type 4 (GLUT4) ist ein membranständiges Transportprotein, welches für die Glukose-Aufnahme in Fett- und Muskelzellen zuständig ist. Diese Aufnahme wird durch Muskelkontraktionen gefördert. Ein *Glut4*-Gen-Defekt kann zu einer Insulinresistenz führen, welche eine Diabetes Typ II-Erkrankung auslöst (Antonescu *et al.*, 2009).

Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDK4) spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Glukose- und Fettsäuren-Metabolismus, indem es die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase in den Mitochondrien reguliert (Kwon und Harris, 2004).

Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) ermöglicht durch einen Umbau von Palmitoyl-CoA zu Palmitoylcarnitin den Fettsäuren den Transport in die Mitochondrien (López-Viñas *et al.*, 2007).

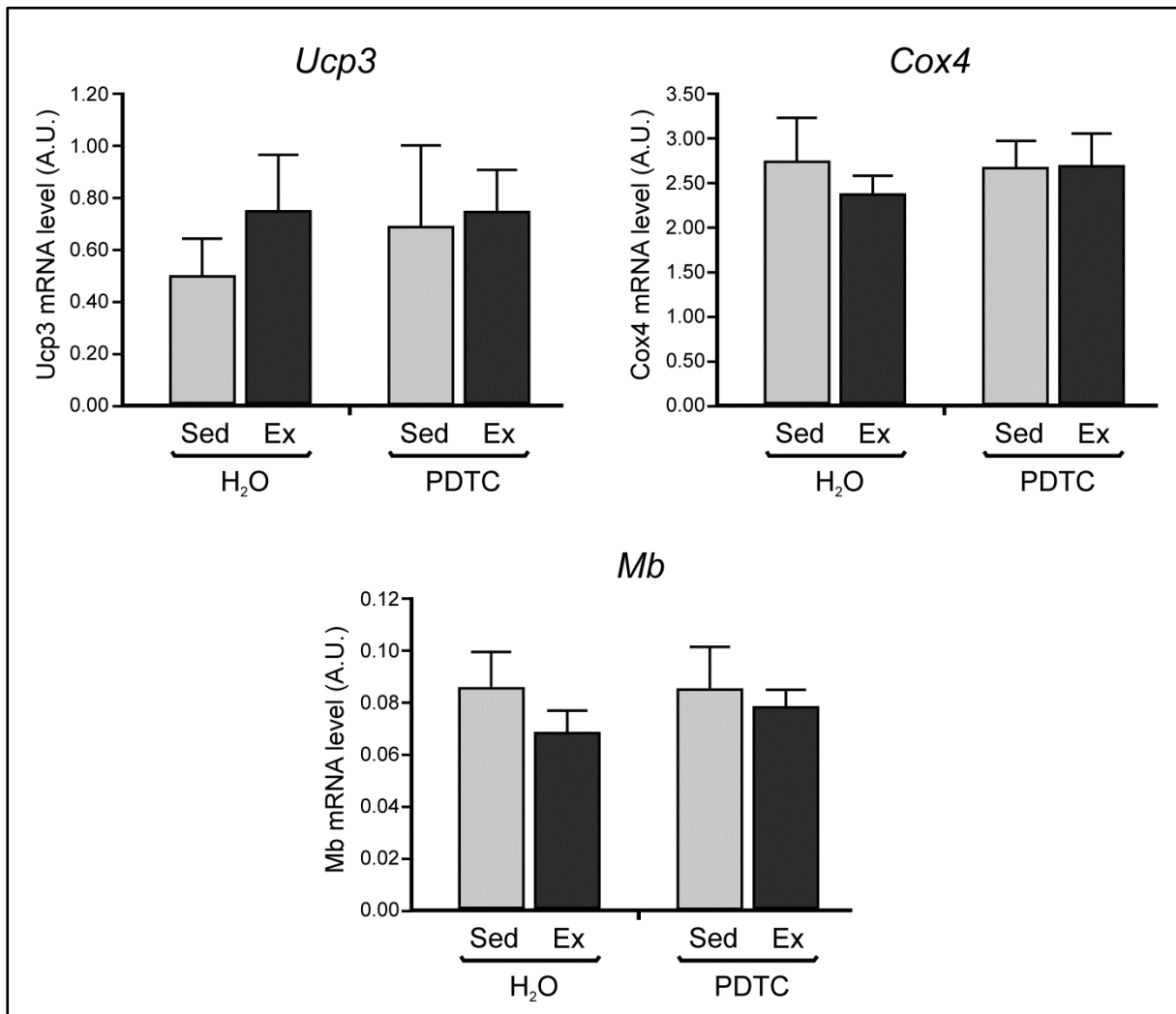


Abb. 14: Einfluss von Lauftraining und/oder NF-κB-Hemmung auf die mRNA-Expression von *Ucp3*, *Cox4* und *Mb* im *M. tibialis anterior*

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) +/- SD von untrainierten Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und Mäusen nach 10-wöchigem Laufbandtraining (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF-κB-Hemmung (n = 4).

Uncoupling protein 3a (UCP3) entkoppelt als mitochondriales Membranprotein die Adenosintriphosphatproduktion von der Atmungskette. Dies führt zur Thermogenese und einem effektiveren Energiehaushalt in den Mitochondrien (Übersicht bei Nabben und Hoeks, 2008).

Cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4) katalysiert in der Atmungskette die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (Liang *et al.*, 2016).

Myoglobin (MB) ist als muskuläres Protein für den Sauerstofftransport verantwortlich (Ordway und Garry, 2004).

Bezüglich des Expressionsniveaus der o. g. Gene wurden in dieser Arbeit im *M. tibialis anterior* keine signifikanten Effekte beobachtet (Abb. 13 und Abb. 14), was dafür spricht, dass weder Training noch eine NF- κ B-Hemmung einen längerfristigen Einfluss darauf haben.

4.2.2.5 Auswirkung einer NF- κ B-Hemmung durch PDTC auf die Expression von Genen, die für Sarkomer-Strukturproteine kodieren

Myh1, Myh2 und Myh7

Der Skelettmuskel verfügt über viele verschiedene Möglichkeiten, sich an körperliche Belastung anzupassen. Die Transformation der Myosin-Schwerketten-Isoformen (*MyHC*), welche für muskuläre Strukturen und Funktionen bestimmend sind, stellt dabei einen der bedeutendsten Mechanismen der muskulären Anpassung dar (Steinacker *et al.*, 2002). Entsprechend der funktionellen Anforderung kommt es durch Ein- bzw. Abbau der verschiedenen MHC-Isoformen zu einem veränderten Faseraufbau, assoziiert mit metabolischen Veränderungen und modifizierten funktionellen Eigenschaften, insbesondere bezüglich Schnelligkeit und Kraft der Muskelfaser (Pette und Staron, 1997). Durch ein Ausdauertraining verändert sich der Muskelfasertyp hin zu einem langsam kontrahierenden, ausdauernden und ermüdungsresistenten Typ-I, im Gegensatz zu den auf Schnellkraft spezialisierten Typ-II-Fasern (Andersen *et al.*, 1994).

ACTN3

Alpha actinin 3 (ACTN3) sorgt durch die Verbindung des Strukturproteins Aktin mit anderen Proteinen für die nötige Stabilität der Aktinfilamente und ist somit in die Kontraktion der Skelettmuskulatur involviert. *Actn3* ist ausschließlich in schnell kontrahierenden, glykolytischen Muskelfasern (Typ-IIx) exprimiert. Ein Mangel an *Actn3* wirkt sich nachteilig auf die Muskelfunktion bei Sprints und Krafttraining aus. Ein kompletter *Knock-Out* von *Actn3* führte in einem Tierversuch mit Mäusen zu einem Muskelfaserumbau von schnellen, glykolytischen Fasern (Typ-IIb) hin zu einem langsam kontrahierenden, oxidativen Phänotyp (Typ-IIa und -I) (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Wie in Abb. 15 dargestellt, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit zumindest in Bezug auf *Myh7*, welches vor allem in Typ-I-Fasern vorkommt, eine entsprechende Tendenz: Die Ex-

pression des entsprechenden Gens lag bei den „Läufern“ höher als bei den „Nichtläufern“. Eine PDTC-Gabe bewirkte jedoch eine gegenläufige Reaktion. Allerdings ergaben sich aufgrund großer interindividueller Unterschiede hohe Standardabweichungen und keine Signifikanz. Bezüglich der Expression des *Myh1*- und des *Myh2*-Gens, welche charakteristisch für schnelle und intermediäre Fasern sind, sowie für den Marker *Actn3* war hingegen in diesem Muskel weder ein Effekt des Trainings noch der Medikation mit PDTC zu beobachten.

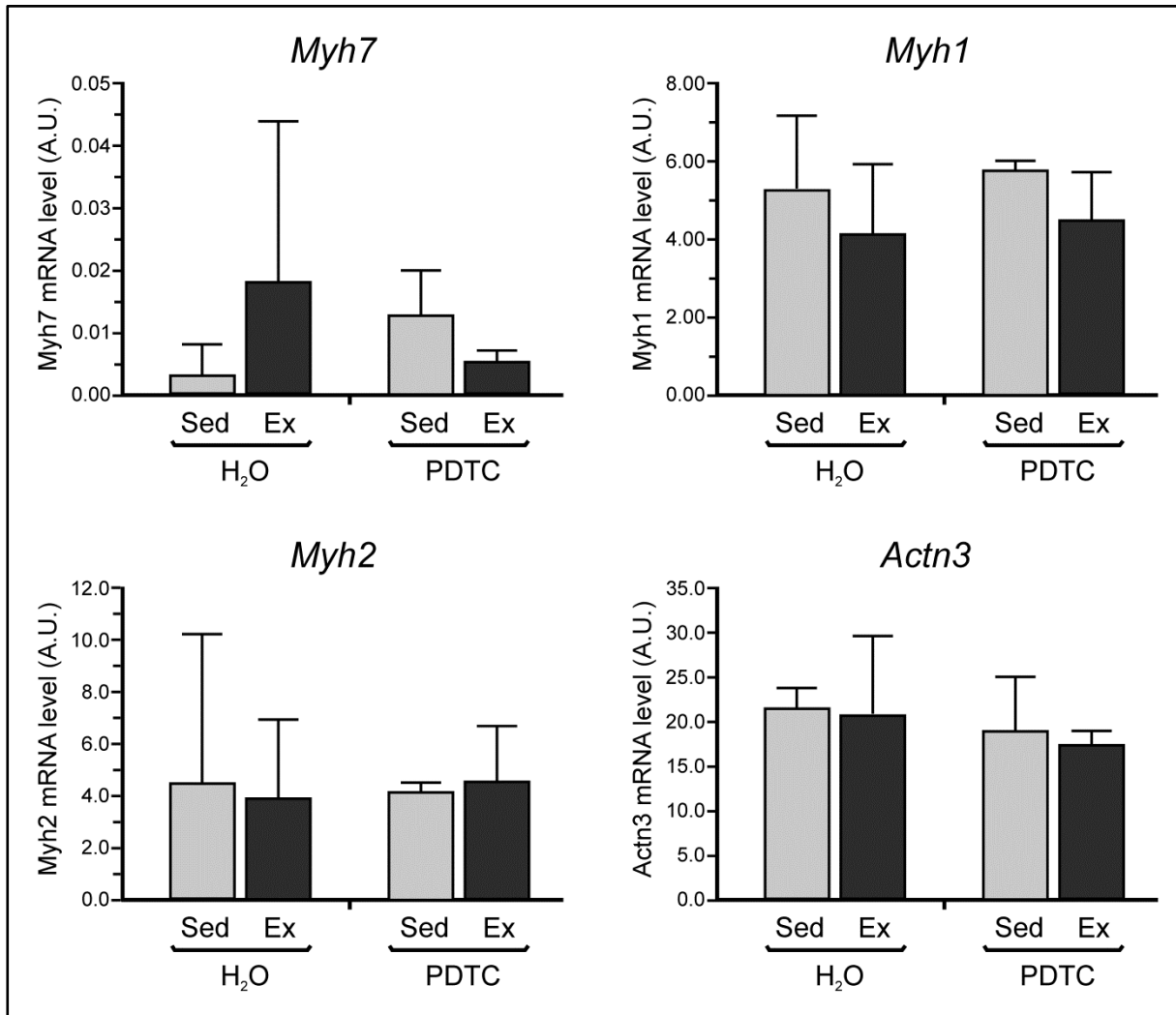


Abb. 15: Einfluss von Lauftraining und/oder NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression von *Myh7*, *Myh1*, *Myh2* und *Actn3* im *M. tibialis anterior*

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD von untrainierten Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und Mäusen nach 10-wöchigem Laufbandtraining (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

4.2.2.6 Auswirkungen einer NF- κ B-Hemmung durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression von *Myostatin*

Myostatin (MSTN) ist Mitglied der TGF- β -Familie von Wachstumsfaktoren. Es ist möglich, dass dieser Faktor das Muskelwachstum negativ beeinflusst, um eine unkontrollierte Zunahme an Muskelmasse zu verhindern. Schon im Jahr 1997 wurden Myostatin-*Knock-Out*-Mäuse generiert, bei denen eine extreme Zunahme an Muskelmasse sowohl durch Hypertrophie als auch Hyperplasie festgestellt wurde (McPherron *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2016).

Die Expression des *Mstn*-Gens wird über den Myostatin-Promotor gesteuert, welcher NF- κ B-Bindungsstellen enthält (Ma *et al.*, 2001). MSTN kommt hauptsächlich in der Skelettmuskulatur und nur geringfügig im Fettgewebe vor. Ein *Knock-Out* führt somit neben der Muskelmassezunahme zu einem Abbau an Fettgewebe (Gu *et al.*, 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit waren keine signifikanten Veränderungen des Expressionsmusters von *Mstn* in Antwort auf Training und/oder eine PDTC-Behandlung zu erkennen (Abb. 16).

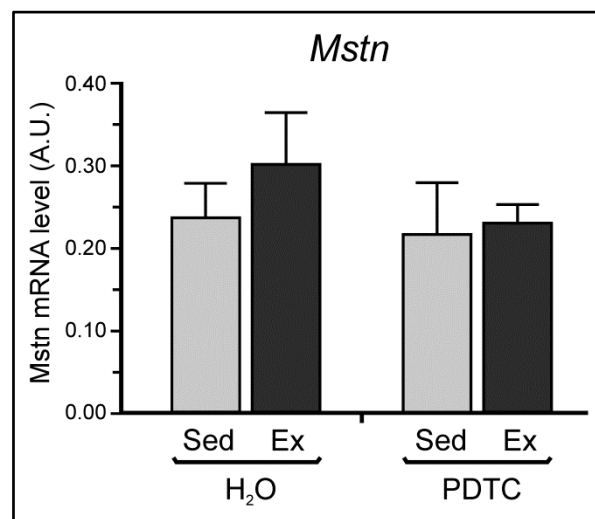


Abb. 16: Einfluss von Lauftraining und/oder NF- κ B-Hemmung auf die *Mstn* mRNA-Expression im *M. tibialis anterior*

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD von untrainierten Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und Mäusen nach 10-wöchigem Laufbandtraining (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

4.2.2.7 Auswirkungen einer Hemmung von NF- κ B durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression von Genen, die für sarkomerassoziierte Chaperone (*Atrogin-1*, *Murf1*, *Smyd1*, *skNac*) kodieren

Molekulare Chaperone sind Proteine, die anderen, neu synthetisierten Proteinen bei der korrekten Faltung „behilflich“ sind, indem sie diese vor schädlichen Reaktionen wie Aggregation oder Interaktion mit anderen Proteinen durch eigene Interaktion mit diesen Proteinen schützen. Chaperone führen dadurch zu einer effizienteren Proteinfaltung. Sie können dabei den gesamten Faltungsprozess eines Proteins begleiten, beginnend mit der Bindung naszierender Polypeptidketten an den Ribosomen (Übersicht bei Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Chaperone spielen aber auch bei Um- und Abbauprozessen von Proteinen und Proteinkomplexen eine Rolle, im Skelettmuskel insbesondere im Bereich der Sarkomere. Hier veranlassen sie die präzise Faltung und den Zusammenbau der Filamentproteine (hauptsächlich Myosin und Aktin) zu organisierten Sarkomeren (Gazda *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte eines Ausdauertrainings, mit und ohne PDTC-Behandlung, auf die Expression der für die Chaperone *Atrogin-1*, *Murf1*, *skNac* und *Smyd1* kodierenden Gene untersucht.

Atrogin-1

Atrogin-1 ist als eine E3-Ubiquitin-Ligase mit dem Ubiquitin-Proteasom-System zum Abbau von Proteinen assoziiert. Induziert wird die Expression des *Atrogin-1*-Gens durch verschiedene Stressfaktoren wie z. B. durch eine Behandlung mit Glukokortikosteroiden oder durch metabolische Veränderungen. *Atrogin-1* beeinflusst den Proteinhaushalt negativ im Sinne eines Katabolismus‘ und ist bei Krankheiten, die mit einem vermehrten Muskelabbau einhergehen, wie z. B. Tumorerkrankungen, innerhalb kürzester Zeit deutlich erhöht. *Atrogin-1* ist zudem bei Untrainierten höher exprimiert als bei Trainierten (Übersicht bei Bodine und Baehr, 2014; Gomes *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls, dass *Atrogin-1* bei den untrainierten Mäusen signifikant höher exprimiert ist als bei den „Läufern“. Nach Gabe von PDTC wurden hingegen, unabhängig davon, ob ein Training stattgefunden hatte oder nicht, *Atrogin-1*-Expressionsniveaus nachgewiesen, wie sie auch bei den unbehandelten, trainierten Tieren zu beobachten waren (Abb. 17).

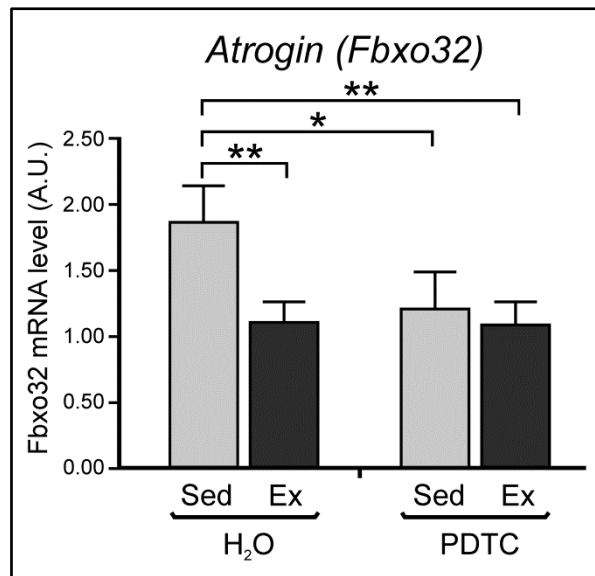


Abb. 17: Einfluss von Lauftraining und/oder NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression des Atrogin-Gens (*Fbxo32*) im *M. tibialis anterior*

Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD von untrainierten Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und Mäusen nach 10-wöchigem Laufbandtraining (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4; * = p < 0,05, ** = p < 0,01).

Auf Proteinebene konnten dagegen keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Konzentration von Atrogin-1 im Skelettmuskel beobachtet werden (Abb. 18).

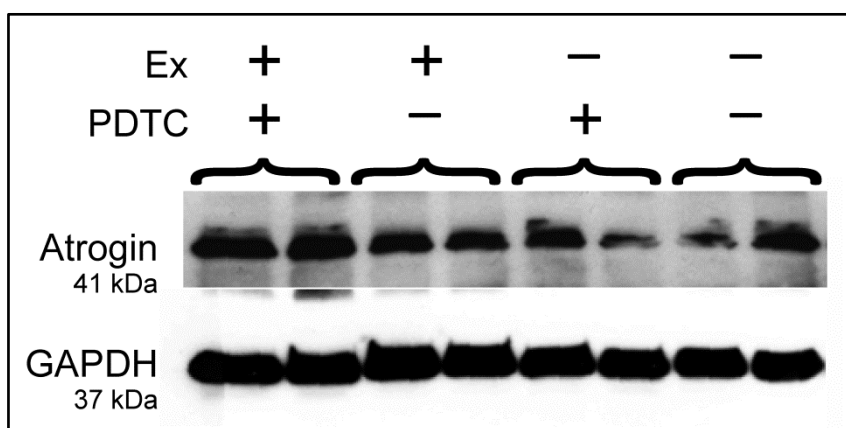


Abb. 18: Repräsentative *Western-Blot*-Analyse der Atrogin-1-Proteinkonzentrationen nach NF- κ B-Hemmung (PDTC) und/oder Lauftraining (Ex) im *M. tibialis anterior*

MURF1

Das *muscle ring-finger protein-1* (MURF1) gehört ebenso wie Atrogin-1 zu den E3-Ubiquitin-Ligasen. *Murf1* wird im Herz- und Skelettmuskel und in einigen anderen Geweben, wie z. B. der Iris, exprimiert (Spencer *et al.*, 2000). MURF1 ist im Zytosol, an der Z-Scheibe des Sarkomers und an weiteren Sarkomerstrukturen lokalisiert (Übersicht bei Bodine und Baehr, 2014; Centner *et al.*, 2001; McElhinny *et al.*, 2002). Vergleichbar mit Atrogin-1 ist seine Konzentration bei Muskelatrophien stark erhöht und es spielt allgemein beim Muskelabbau eine wichtige Rolle (Übersicht bei Foletta *et al.*, 2011).

skNAC

Skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex alpha (skNAC) ist ein Protein, welches ausschließlich im Skelett- und Herzmuskel vorkommt (Li *et al.*, 2009). NAC allgemein stellt ein Protein dar, das an neu entstehende Polypeptidketten binden kann, also an solche, die gerade im Ribosom neu synthetisiert werden und zum Teil aus diesem herausragen (Wiedmann *et al.*, 1994). *skNac* wird während der Skelettmuskelregeneration sowie der Skelettmuskeldifferenzierung exprimiert (Munz *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2010). Dabei ist es in den Aufbau der Myofibrillen involviert (Li *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2012).

SMYD1

Set and mynd domain containing 1 (SMYD1) interagiert mit skNAC (Sims *et al.*, 2002) und ist ebenso wie dieses herz- und skelettmuskelspezifisch, mit Ausnahme einer speziellen Isoform, die auch in zytotoxischen T-Lymphozyten vorkommt (Hwang und Gottlieb, 1997). Smyd-Proteine induzieren Chromatinveränderungen und regulieren so die Transkription verschiedener Gene (Du *et al.*, 2014).

Wie Abb. 19 zeigt, waren bezüglich des Expressionsmusters der für die Chaperone *Smyd1*, *skNac* und *Murf1* kodierenden Gene weder nach einem Ausdauertraining noch nach einer PDTC-Gabe Veränderungen zu beobachten, im Gegensatz zu den deutlichen Effekten auf die *Atrogin-1*-Expression.

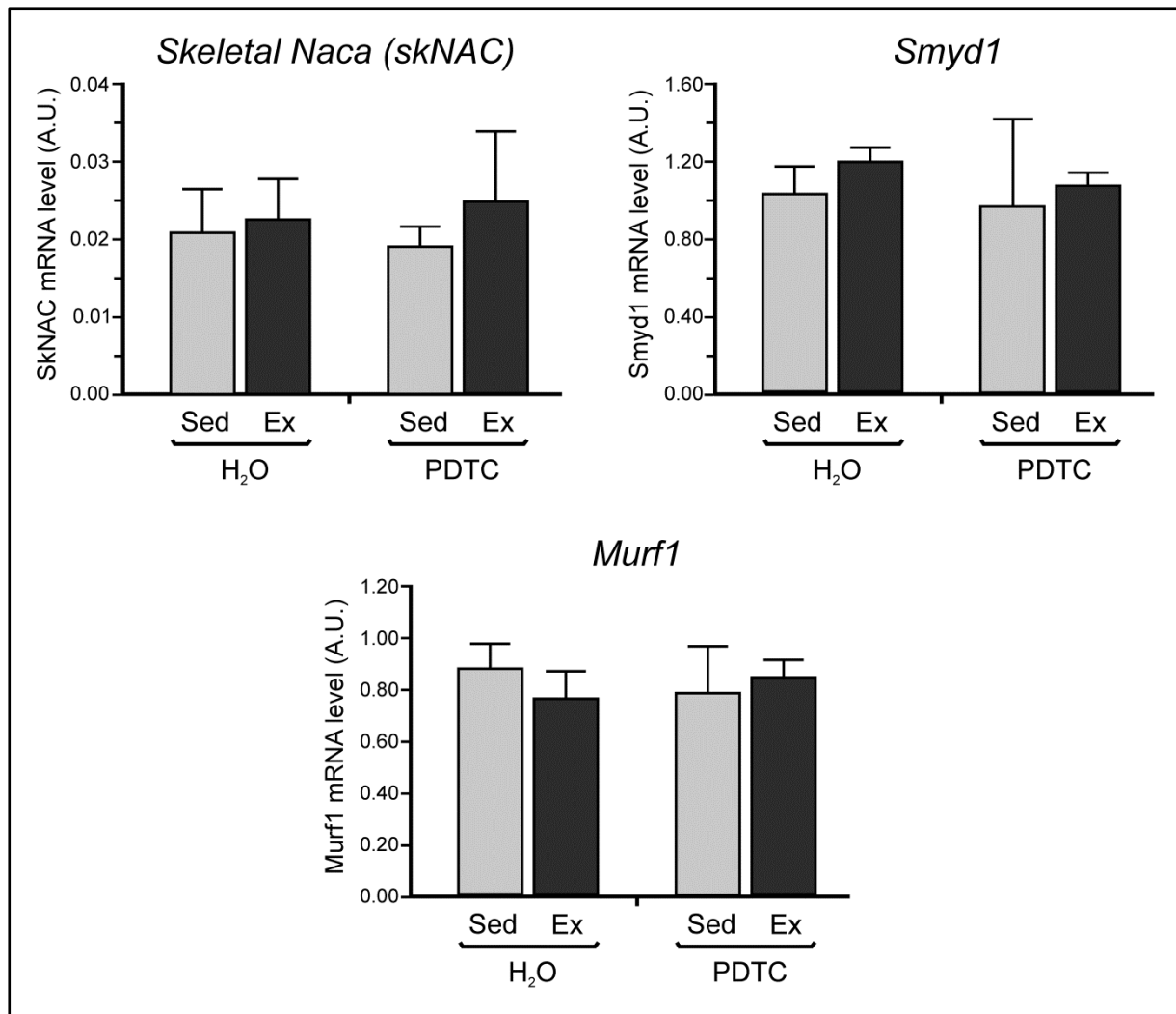


Abb. 19: Einfluss von Lauftraining und/oder NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression von *skNAC*, *Smyd1* und *Murf1* im *M. tibialis anterior*

Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD von untrainierten Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und Mäusen nach 10-wöchigem Laufbandtraining (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

4.3 Reaktion des Skelettmuskels auf ein einmaliges Lauftraining

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Effekte eines einmaligen, einstündigen „Akuttrainings“ sowie einer Medikation mit PDTC auf den *M. tibialis anterior* analysiert.

Dazu wurde der *M. tibialis anterior* drei Stunden nach dem Ende der Trainingseinheit bzw. zum entsprechenden Zeitpunkt bei den „Nichtläufer“-Kontrolltieren entnommen. Die Hälfte beider Gruppen erhielt zusätzlich, zwei Stunden vor der Trainingseinheit, eine einmalige, intraperitoneale Behandlung mit PDTC (s. 3.2.2.3).

4.3.1 Verhalten der „Akutmäuse“ im Experiment

Für das einmalige „Akuttraining“ wurden, wie für die mehrwöchige Trainingsstudie, C57BL/6J-Mäuse im Alter von sechs bis sieben Wochen eingesetzt. Das Anfangsgewicht der Tiere bewegte sich ebenfalls im Durchschnitt um 21 g. Die Tiere wurden auf Anraten des Tierschutzbeauftragten und aufgrund der einzelnen Rankämpfe bei den chronischen Gruppen zu zweit bzw. sogar einzeln gehalten. Diese Haltungsform zog jedoch mehrere negative Folgen nach sich: In den Käfigen mit je zwei Tieren kam es teilweise zu intensiven Rankämpfen, sodass die Tiere getrennt werden mussten. Bei den einzeln gehaltenen Tieren war ein Häuschen als Rückzugsmöglichkeit vorgeschrieben. Dies nutzten einzelne Tiere, um von diesem aus ohne körperliche Anstrengung das Futter aus der Futtermulde im Käfigdeckel zu erreichen. Somit entstanden teilweise Differenzen in der Dauer der Futteraufnahme. Die „Akutmäuse“ wirkten beim Handling durch Experimentatoren und Pflegepersonal deutlich gestresster, insbesondere die Tiere aus den Einzelkäfigen. Allgemein beobachteten Wissenschaftler und Tierpfleger einen Anstieg der Stresssymptomatik, je weniger Tiere sich in einem Käfig befanden. Auch im Vergleich zu den „chronischen Mäusen“ wurde dies deutlich. Wie in der „chronischen“ Gruppe gab es in der „Akutgruppe“ ebenfalls keine „laufunwilligen“ Tiere, zumindest nicht in dem Ausmaß, dass ein Tier aus dem Experiment hätte genommen werden müssen.

4.3.2 Einfluss der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC und eines einmaligen Lauftrainings auf die I κ B- α -, TRAF6- und PGC-1 α -Proteinkonzentration

4.3.2.1 Auswirkung der NF- κ B-Hemmung auf die Expression der für I κ B- α , TRAF6 und PGC1- α kodierenden Gene auf Proteinebene

Bezüglich der Proteinkonzentrationen von I κ B- α , TRAF6 und PGC1- α konnten im Vergleich „Läufer“ versus „Nichtläufer“, sowie PDTC-Behandlung versus NaCl-Behandlung keine signifikanten Unterschiede erkannt werden (s. Abb. 20).

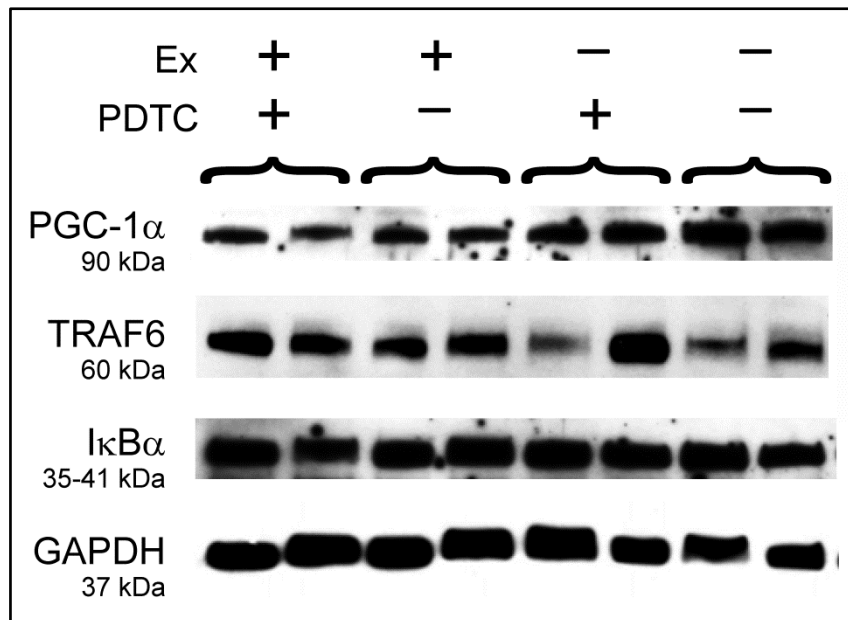


Abb. 20: Darstellung einer repräsentativen *Western Blot*-Analyse des *M. tibialis anterior* zum Einfluss von Akutbelastung und NF-κB-Hemmung.

Es wurden pro Gel auch hier jeweils die aus zwei Tieren je Kombination (Akutbelastung (Ex)/kein Training bzw. PDTC-Gabe/keine PDTC-Gabe) gewonnenen Proteinlysate der vier Gruppen verglichen. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde der Nachweis des Referenzproteins GAPDH durchgeführt. Die Abbildung zeigt jeweils charakteristische Banden für IκB-α (bei 35-41 kDa), TRAF6 (60 kDa), PGC-1α (90 kDa) sowie für das *Housekeeping*-Protein GAPDH (37 kDa).

4.3.3 Einfluss der Hemmung der NF-κB-Aktivität durch PDTC und eines Lauftrainings auf die Expression ausgewählter Marker auf RNA-Ebene

Bei den „Akutmäusen“ wurden insbesondere Gene untersucht, von denen aus Arbeiten anderer Autoren bekannt ist, dass sie nach einer akuten Belastung im Skelettmuskel induziert werden, wie beispielsweise *Il-6r*, *Cxcl-5* oder *Pgc-1α* (Übersicht bei Lenk *et al.*, 2010; Nedachi *et al.*, 2008).

4.3.3.1 Auswirkungen einer NF-κB-Hemmung durch PDTC und einer Laufbelastung auf die Expression entzündungsassoziierter Gene wie *Il-6r*, *Cxcl-5* und *Egr1*

IL-6R

Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) ist membrangebunden und befindet sich ausschließlich auf Leberzellen und Leukozyten. Er ist von großer Bedeutung, da Interleukin-6 (IL-6) seine biologi-

schen Aktivitäten neben dem Glykoprotein 130 (gp130) über den IL-6R ausführt. Das Glykoprotein 130 kommt ubiquitär vor (Übersicht bei Mihara *et al.*, 2012). IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Bei Skelettmuskelatrophien im Rahmen chronisch entzündlicher Krankheiten ist seine Konzentration im Plasma ebenso deutlich erhöht wie z. B. die von Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). IL-6 wird dabei, wie auch andere proinflammatorische Zytokine, in Zellen des Immunsystems, aber auch in Muskelzellen selbst gebildet (Ostrowski *et al.*, 1998; Saini *et al.*, 2006). Durch diese Zytokine werden verschiedene Signalwege, u. a. die Aktivierung von NF- κ B, initiiert. Der IL-6-Spiegel kann aber auch bei einer intensiven körperlichen Belastung bis zum Zehnfachen über dem Ruhewert liegen (Pedersen *et al.*, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Il6r*-Rezeptor-Gens auf RNA-Ebene bei den Tieren, die ein Training absolviert hatten, 2,5-mal höher war als bei den unbehandelten „Untrainierten“. Nach PDTC-Behandlung war die Expression dann hingegen wieder signifikant verringert und zeigte ein mit den unbehandelten, nichttrainierten Tieren vergleichbares Niveau. Diese Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt.

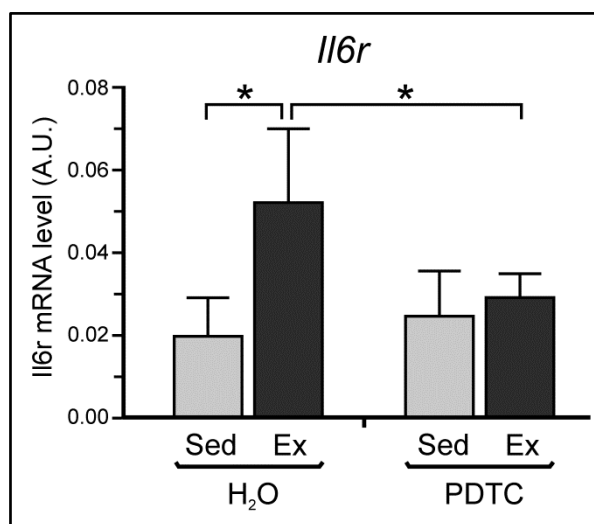


Abb. 21: Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression des IL-6-Rezeptor-Gens (*Il6r*) im *M. tibialis anterior* nach akuter Laufbelastung

Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD in Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und 3 h nach akuter Laufbelastung (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4; * = p < 0,05).

CXCL-5

Chemokine (cxc-motif) ligand 5 (CXCL-5) stimuliert die Chemotaxis von Leukozyten und reguliert die Homöostase der neutrophilen Granulozyten. Zudem besitzt das *Cxcl-5*-Gen NF- κ B-Bindungsstellen (Übersicht bei Craig *et al.*, 2009). Bei den im Rahmen dieser Arbeit un-

tersuchten unbehandelten Tieren war tendenziell die *Cxcl-5*-Expression auf RNA-Ebene nach Training gegenüber den „Nichtläufern“ erhöht. Nach einer parallelen Medikation mit PDTC war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten (s. Abb. 22).

EGR1

Early growth factor 1 (EGR1) hat bei akuten und chronischen pathologischen Prozessen wie z. B. Arteriosklerose, Entzündungsprozessen, ischämiebedingten Reperfusionsschäden oder Transplantat-Abstoßungen eine Schlüsselrolle inne (Chapman und Perkins, 2000; Schmidt *et al.*, 2008). Skorokhod *et al.* konnten 2012 zeigen, dass *Egr1* bei Vorgängen, die mit Muskelverlust einhergehen, deutlich induziert wird. Dies deutet eine Rolle von EGR1 bei der systemischen Entzündungsantwort des Skelettmuskels an.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tiere, die ein Training absolviert hatten, war die *Egr1*-Expression gegenüber den Tieren, die nicht trainiert hatten, erhöht. Durch PDTC-Gabe wurden diese Effekte nivelliert (Abb. 22). Diese Unterschiede erreichten jedoch kein Signifikanzniveau.

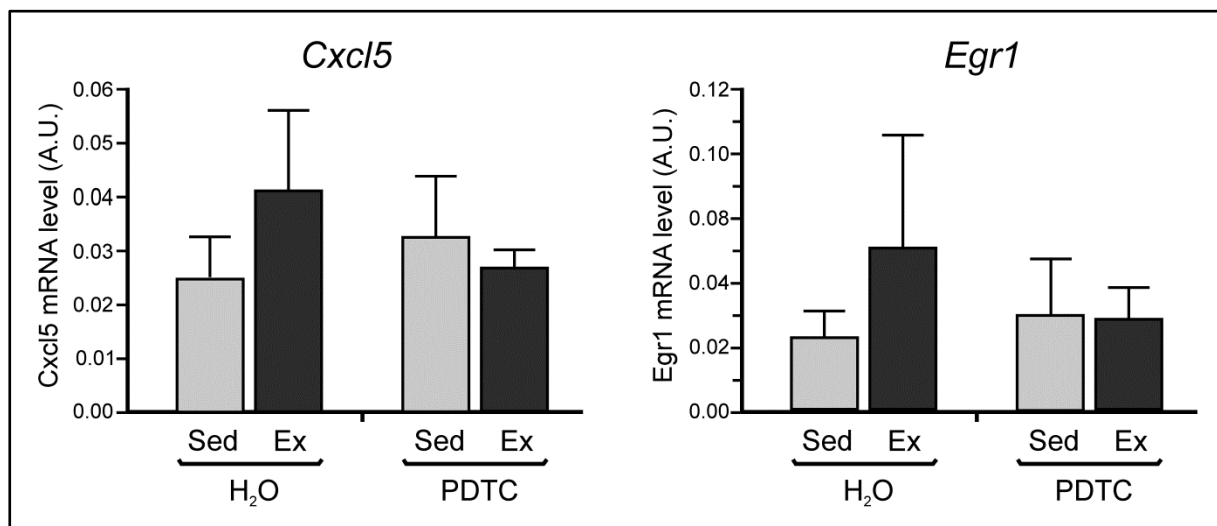


Abb. 22: Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression von *Cxcl5* und *Egr1* im *M. tibialis anterior* nach akuter Laufbelastung

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD in Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und 3 h nach akuter Laufbelastung (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

4.3.3.2 Expression der mit Anti-Inflammation assoziierten Gene *Zfp36*, *Atf3* und *Maff* nach einer Hemmung von NF- κ B durch PDTC

Pillon *et al.* bestätigten 2013, dass für die Adaptation der Muskulatur an körperliches Training und auch für Reparaturprozesse eine spezifische Entzündungsantwort notwendig ist, jedoch ein unkontrollierter andauernder Entzündungsprozess zu einem Verlust an Muskelmasse,

Leistungsfähigkeit und Kraft führt. Folglich ist die Annahme naheliegend, dass es auch Strategien geben muss, die eine Entzündungsantwort kontrolliert wieder auflösen. Mittlerweile sind einige dieser Mechanismen und in Ansätzen auch ihre Bedeutung für die Trainingsanpassung des Skelettmuskels bekannt (Übersicht bei Beiter *et al.*, 2015). Daher wurden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit einige Markergene analysiert, die mit antiinflammatorischen Prozessen in Zusammenhang stehen.

ZFP36

Zinc finger protein 36 (ZFP36) ist eines der Proteine, die eine Entzündungsreaktion reprimieren können. Dazu bindet es an spezifische RNA-Erkennungs-Sequenzen, insbesondere an AU-reiche Elemente, die sich vermehrt in Transkripten befinden, die für Entzündungsmediatoren kodieren. Über diese Bindung leitet ZFP36 anschließend deren Abbau ein. Es könnte somit eine wichtige Rolle bei der Steuerung der muskulären Entzündungsantwort spielen. Zudem könnte es auch an der Aktivierung und Differenzierung von Satellitenzellen beteiligt sein (Übersicht bei Beiter *et al.*, 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die *Zfp36*-Expression drei Stunden nach dem Lauftraining deutlich reduziert, allerdings nur innerhalb der PDTC-behandelten Gruppe. Bei den NaCl-behandelten Kontrolltieren war zu diesem Zeitpunkt kein Effekt des Laufens auf die Expression dieses Gens zu beobachten (Abb. 23).

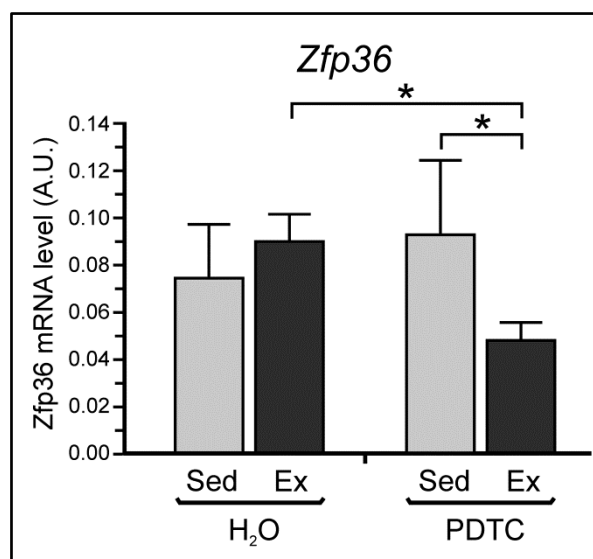


Abb. 23: Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression des *Zfp36*-Gens im *M. tibialis anterior* nach akuter Laufbelastung

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD in Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und 3 h nach akuter Laufbelastung (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4; * = p < 0,05).

ATF3

Activating transcription factor 3 (ATF3) kann als transkriptioneller Aktivator oder Repressor wirken. Das Protein spielt eine Schlüsselrolle als Inhibitor von Entzündungsprozessen (Übersicht bei Hai *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten, eventuell aufgrund großer interindividueller Unterschiede und einer hohen Standardabweichung, keine signifikanten Expressionsänderungen des Gens *Atf3* in Antwort auf eine Trainingseinheit oder eine PDTC-Behandlung festgestellt werden (s. Abb. 24).

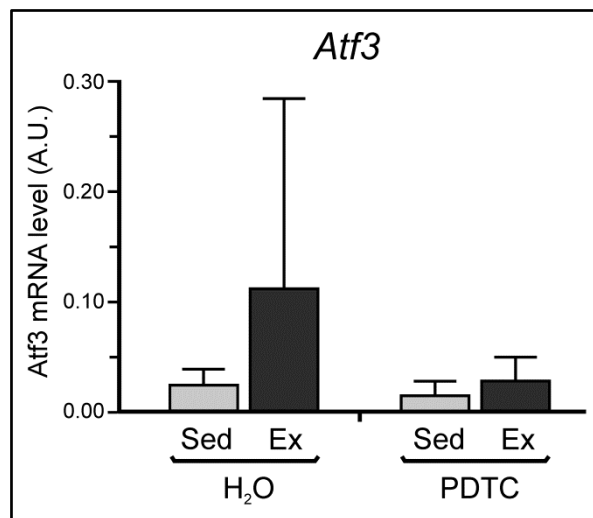


Abb. 24: Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression des *Atf3*-Gens im *M. tibialis anterior* nach akuter Laufbelastung

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD in Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und 3 h nach akuter Laufbelastung (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

MAFF

V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family homolog f (MAFF) ist ein Mitglied der *small MAF transcription factors* (Neubauer *et al.*, 2014). Diese spielen eine wichtige Rolle in der oxidativen Stressantwort und sind in die Pathogenese von Krankheiten wie Diabetes, Thrombozytenpenie, Krebs und neuronalen Störungen involviert (Übersicht bei Kannan *et al.*, 2012).

Wie in Abb. 25 veranschaulicht, war die *Maff*-Expression bei den unbehandelten „Läufern“ im Vergleich zu den unbehandelten „Nichtläufern“ 2,5-fach erhöht. Nach PDTC-Behandlung war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten.

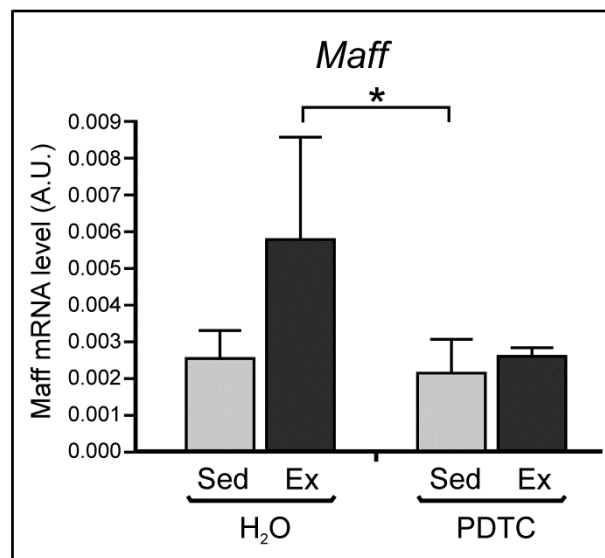


Abb. 25: Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression des *Maff*-Gens im *M. tibialis anterior* nach akuter Laufbelastung

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD in Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und 3 h nach akuter Laufbelastung (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4; * = p < 0,05).

4.3.3.3 Einfluss der Hemmung von NF- κ B und einer Laufbelastung auf Gene, die für Regulatoren des Skelettmuskelmetabolismus kodieren

PPP1R3A

Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3 a (PPP1R3A) kodiert für die glykogenassoziierte Form der Proteinphosphatase 1 (PP1). Diese Untereinheit der PP1 ist, anders als die drei anderen Untereinheiten, hauptsächlich im quergestreiften Muskel zu finden und dort in die Regulation des Glykogenmetabolismus involviert (Übersicht bei Newgard *et al.*, 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte die Untersuchung auf RNA-Ebene, dass bei den Tieren, die kein Training absolviert hatten, die *Ppp1r3a*-Expression tendenziell höher war als nach einer Trainingseinheit. PDTC scheint diese Expression tendenziell zu verstärken. Nach einer PDTC-Applikation war die *Ppp1r3a*-Expression der trainierenden Tiere signifikant gegenüber der der unbehandelten „Läufer“ erhöht (Abb. 26).

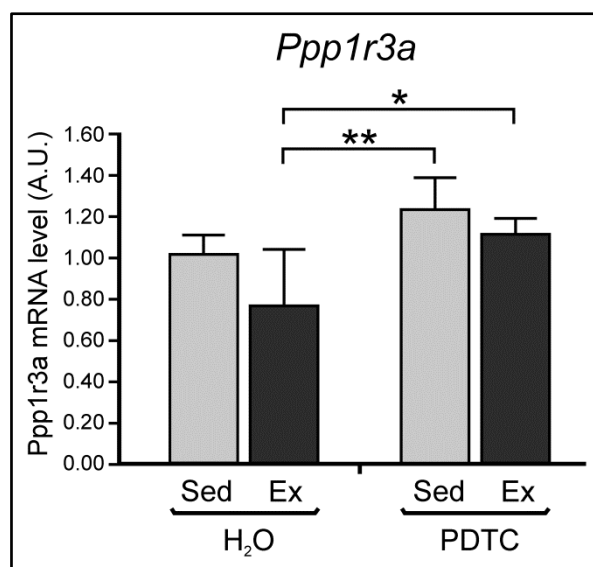


Abb. 26: Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression des *Ppp1r3a*-Gens im *M. tibialis anterior* nach akuter Laufbelastung

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD in Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und 3 h nach akuter Laufbelastung (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4; * = p < 0,05, ** = p < 0,01).

NR4A3

Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3 (NR4A3) gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren. Diese können DNA binden und metabolische und endokrine Signale in die Expression entsprechender Gene umwandeln (Übersicht bei Zhao und Bruemmer, 2010). Im Skelettmuskel kommt es bei körperlichem Training über eine belastungsinduzierte Ausschüttung von Katecholaminen und nachfolgend eine β 2-adrenerge Stimulation zur Aktivierung von Nr4a3 (Steinacker *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließ sich beim Vergleich der untrainierten Tiere der Trend erkennen, dass bei den „Nichtläufern“ mit paralleler PDTC-Medikation die Expression von *Nr4a3* reprimiert wurde. Reaktionen auf einen Trainingsreiz konnten dagegen nicht festgestellt werden. Jedoch hemmt PDTC tendenziell die allgemeine Expression von *Nr4a3* (Abb. 27).

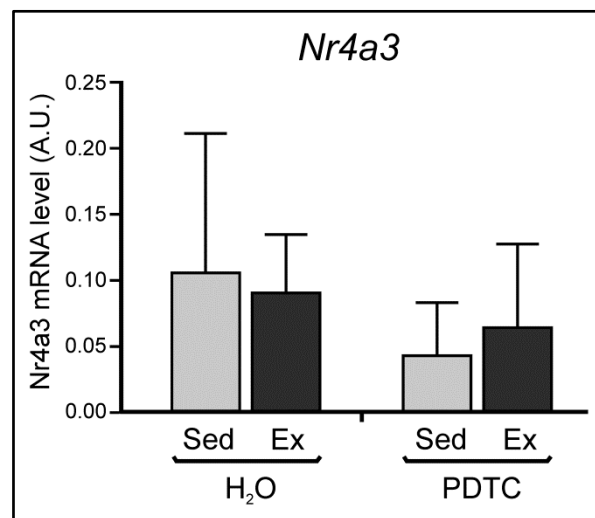


Abb. 27: Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die mRNA-Expression des *Nr4a3*-Gens im *M. tibialis anterior* nach akuter Laufbelastung

Dargestellt sind die gemittelten normalisierten Expressionswerte (A.U., arbitrary units) \pm SD in Kontrolltieren (*sedentary*, Sed) und 3 h nach akuter Laufbelastung (*exercise*, Ex) mit (PDTC) und ohne (H₂O) NF- κ B-Hemmung (n = 4).

5. Diskussion

Bisher gibt es nur wenige, systematisch durchgeführte Studien bzw. standardisierte Tierversuche zu der Thematik, wie die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade durch körperliche Aktivität beeinflusst wird. Die meisten Arbeiten deuten dabei auf eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in Antwort auf einen Trainingsreiz hin (Ji *et al.*, 2004; Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007; Vella *et al.*, 2012). Hinzu kommt, dass zu einer möglichen NF- κ B-Funktion bei der Trainingsanpassung der Skelettmuskulatur noch keinerlei Daten existieren. Insbesondere wurde noch nicht erforscht, wie sich eine Hemmung von NF- κ B auf die Skelettmuskelanpassung nach einem Trainingsreiz auswirkt. In dieser Arbeit wurde daher einerseits untersucht, ob und wie sich die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel in Antwort auf einen Trainingsreiz ändert. Zudem wurden die Auswirkungen einer NF- κ B-Hemmung durch das Dithiocarbamat PDTC auf die Trainingsanpassung des Skelettmuskels nach einem einmaligen, „akuten“ sowie einem regelmäßigen, „chronischen“ Lauftraining analysiert.

5.1 Welche Effekte hat ein „chronisches“ Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität und wie erfolgt die Trainingsanpassung des Skelettmuskels unter NF- κ B-Inhibition?

Die Auswirkungen von „chronischem“, d. h. mehrwöchigem und regelmäßigem Training auf die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade in der Skelettmuskulatur werden bis heute kontrovers diskutiert; systematische Studien fehlen. Mehrere Arbeiten beschreiben eine Induktion der NF- κ B-Aktivität nach körperlichem Training (Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007; Brooks *et al.*, 2008), andere Autoren konnten wiederum eine Reduktion der transkriptionellen Aktivität dieses Faktors beobachten (Vogiatzis *et al.*, 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst untersucht, wie sich ein zehnwöchiges Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskelgewebe auswirkt.

5.1.1 Die „chronischen“ Tiere zeigten ein deutlich geringeres Stresslevel als die „Akutmäuse“

Die „chronischen“ Mäuse zeigten sich sowohl beim *Handling* als auch im Verhalten untereinander deutlich entspannter als die „Akutmäuse“. Dies könnte mehrere Ursachen haben: Zum einen wäre ein Gewöhnungseffekt der „chronischen“ Mäuse an ein Handling etc. über einen längeren Zeitraum denkbar, allerdings waren diese Tiere schon Ende der ersten Woche weniger gestresst als die einzeln sitzenden „Akutmäuse“ zum gleichen Zeitpunkt. Zum anderen könnten mehrere Tiere in der Gruppe ein Schutzgefühl entwickeln. Zudem ist die

Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, dass die „chronischen“ Tiere durch das Lauftraining ausgeglichener waren. Die letzte Überlegung wird durch den Aspekt gestützt, dass auch die „chronischen“ Läufergruppen im Vergleich zu den entsprechenden inaktiven Kontrolltieren ein geringes sichtbares Stresspotenzial aufwiesen.

5.1.2 Die PDTC-behandelten Tiere wiesen eine deutlich inhomogenere Gewichtsentwicklung auf

Die PDTC-behandelten Tiere zeigten, im Gegensatz zu den unbehandelten, deutlich stärkere Schwankungen in ihrer Gewichtsentwicklung. Zudem war, anders als bei den Tieren ohne PDTC-Medikation, kein klarer Gewichtsunterschied zwischen trainierenden und nicht trainierenden Tieren zu erkennen. Dies könnte darauf hinweisen, dass PDTC gewisse Aspekte der Trainingsanpassung verhindert. Die teilweise auftretenden größeren interindividuellen Schwankungen könnten ggf. im Zusammenhang mit einer differierenden Trinkwasseraufnahme stehen.

5.1.3 Wie wirkt sich ein zehnwöchiges Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel aus?

In dieser Arbeit konnten nach einem zehnwöchigen Lauftraining keine signifikanten Effekte auf die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel beobachtet werden. Somit ist es möglich, dass der NF- κ B-Signalweg in die langfristigen Trainingsanpassungsvorgänge des Skelettmuskels möglicherweise nicht oder nur wenig involviert ist. Auch Vogiatzis *et al.* (2010) berichteten von einer reduzierten Aktivität des Transkriptionsfaktors bei andauerndem Training über einen längeren Zeitraum.

Zudem ist vermutlich die Art des Trainings (Intensität, Dauer und Frequenz) entscheidend dafür, ob und welche Effekte auf die NF- κ B-Aktivität zu beobachten sind. So konnte in Versuchen gezeigt werden, dass nach einem intensiven, zwölfwöchigen Laufbandtraining, welches bei einer Anfangsgeschwindigkeit von 20 m/min, bei einer Dauer von 5-30 Minuten auf eine Endgeschwindigkeit von 35 m/min über 20 Minuten wöchentlich gesteigert wurde, eine erhöhte NF- κ B-Aktivität vorlag. Nach einem moderaten Trainingsprogramm, bei dem die humanen Probanden vier Mal pro Woche für 45 Minuten auf einem stationären Fahrrad die Trainingsintensität innerhalb der acht Trainingswochen auf bis 70 % ihrer aeroben Kapazität steigerten, war hingegen die Konzentration an inhibitorischen NF- κ B-Proteinen erhöht. Dies spricht für eine reduzierte NF- κ B-Aktivität (Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007). Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Trainingsintensität für die Mäuse zu moderat war, um eine dauerhafte Veränderung der NF- κ B-Aktivität hervorzurufen. Interessant ist, dass eine durch ein Ausdauertraining induzierte Steigerung der NF- κ B-Aktivität bisher hauptsächlich im Tiermodell festgestellt wurde (Übersicht bei

Kramer und Goodyear, 2007; Brooks *et al.*, 2008; Spangenburg *et al.*, 2006). Eine verminderte NF- κ B-Aktivität wurde dagegen hauptsächlich in humanen (Zell-)Studien nachgewiesen (verwiesen in Kramer und Goodyear, 2007; Lambernd *et al.*, 2012; Vogiatzis *et al.*, 2010). Es ist bekannt, dass nicht nur die Anatomie und die Funktion des Skelettmuskels zwischen Mäusen und Menschen variiert, sondern auch dessen molekulare Expression (Kho *et al.*, 2006). Somit sind durchaus speziesspezifische Ergebnisse möglich.

Schließlich scheint die Regulation der NF- κ B-Aktivität durch körperliches Training in verschiedenen Muskeltypen unterschiedlich zu sein. So wurde ein Anstieg der NF- κ B-Aktivität im murinen *M. gastrocnemius* (Brooks *et al.*, 2008) sowie im murinen *M. soleus* und *M. plantaris* (Spangenburg *et al.*, 2006) nach einem Laufbandtraining nachgewiesen. Eine Reduktion wurde dagegen im humanen *M. vastus lateralis* in Antwort auf ein Fahrradtraining beobachtet (Vogiatzis *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass im Rahmen dieser Studie keine Regulation der NF- κ B-Aktivität in Antwort auf das Training beobachtet wurde, könnte also auch im untersuchten Muskeltyp (*M. tibialis anterior*) begründet sein.

5.1.4 Konnte die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel durch PDTC erfolgreich gehemmt werden?

Im nächsten Schritt wurde dann die NF- κ B-Aktivität durch die systemische Gabe des Dithiocarbamats PDTC gehemmt und die Effekte dieser Hemmung auf die Trainingsanpassung des Skelettmuskels analysiert.

PDTC hemmt dabei die Phosphorylierung und den proteasomalen Abbau von I κ B- α . Dadurch kann das an I κ B- α gebundene NF- κ B nicht aktiviert werden und somit nicht in den Zellkern translozieren (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Hayakawa *et al.*, 2003).

Die C57BL/6J-Mäuse der entsprechenden Untersuchungsgruppe wurden dabei über die gesamte Eingewöhnungs- und Trainingsphase hinweg mit PDTC-versetztem Trinkwasser behandelt. Zur Überprüfung des Behandlungserfolgs wurden nach Abschluss des Experiments Proteinlysate des *M. tibialis anterior* auf die Konzentration des NF- κ B-Inhibitors I κ B- α hin analysiert. Da I κ B- α nach NF- κ B-Aktivierung proteasomal abgebaut wird (Mourkioti und Rosenthal, 2008), kann die I κ B- α -Konzentration als direktes, invers korrelierendes Maß für die NF- κ B-Aktivität dienen. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben deutlich höhere I κ B- α -Konzentrationen bei den PDTC-behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Somit kann auf eine erfolgreiche NF- κ B-Hemmung geschlossen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Studien (Chabicovsky *et al.*, 2010; Gu *et al.*,

2009; Mariappan *et al.*, 2010), die bereits zeigen konnten, dass oral appliziertes PDTC auch über einen längeren Zeitraum gut geeignet ist, um NF- κ B effizient zu hemmen. Diese effiziente Wirkung des PDTCs zeigt sich in den signifikanten Ergebnissen der I κ B- α -Konzentration, welche trotz geringer PDTC-Dosis erzielt werden konnten. Zudem deutet dies darauf hin, dass PDTC recht spezifisch wirkt.

Aufgrund der teilweise nur tendenziellen oder fehlenden Effekte bei den anschließend untersuchten Genexpressionsmustern der „chronischen“ Tiere, stellt sich die Frage, ob einzelne Gene bei einer stärkeren Hemmung von NF- κ B vielleicht deutlicher reguliert gewesen wären. Teilweise wurden in anderen Studien auch deutlich höhere Konzentrationen bei der oralen Gabe von PDTC verwendet. So behandelten Mariappan *et al.* (2010) die Tiere über 20 Wochen mit 100 mg/kg/d und Gu *et al.* (2009) sogar mit bis zu 200 mg/kg/d PDTC.

Die orale Anwendung wurde aufgrund verschiedener Literaturverweise gewählt. Chabicovsky *et al.* (2010) konnten zwar nachweisen, dass PDTC ohne Nebenwirkungen und mit einer hohen Absorptionsrate auch intranasal gegeben werden kann, jedoch hätte dies über zehn Wochen hinweg einen zusätzlichen Stressfaktor für die Tiere dargestellt. Die intravenöse oder intraperitoneale Gabe wurde ebenfalls aus Gründen der Stressminimierung, aber auch aufgrund der stärkeren Nebenwirkungen abgelehnt. Bezüglich der Dosis geben Chabicovsky *et al.* (2010) bei Mäusen eine orale, letale Dosis von LD₅₀ = 1559 mg/kg an, verzeichneten jedoch auch bei 750 mg/kg schon Todesfälle und starke Nebenwirkungen. Cuzzocrea *et al.* (2002) verwendeten orale Dosen von 30 und 100 mg/kg und Okabe *et al.* (2013) von 100 mg/kg. Bei einer oralen PDTC-Applikation in Dosen von 100-200 mg/kg wurden keine Nebenwirkungen für Behandlungszeiträume von bis zu 20 Wochen beschrieben (Gu *et al.*, 2009; Mariappan *et al.*, 2010; Okabe *et al.*, 2013). Niedrigere Dosen von 20 mg/kg (Malm *et al.*, 2007) und 10 mg/kg (Cuzzocrea *et al.*, 2002) wurden ebenfalls erfolgreich verwendet.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen negativen Erfahrungswerte mit PDTC-Nebenwirkungen bei den „Akutmäusen“ (siehe Abschnitt 5.2.3), wurde bei den „chronischen“ Tieren eine eher geringere Dosis von 8-10 mg/kg gewählt. Die Tiere vertrugen die Dosis gut und die Wasseraufnahme verlief, trotz der Versetzung des Trinkwassers mit PDTC, konstant.

5.1.5 Wie wirkt sich eine Kombination aus körperlichem Training und einer Hemmung der NF- κ B-Aktivität auf Genexpressionsmuster im Skelettmuskel aus?

5.1.5.1 Weder ein zehnwöchiges Lauftraining noch eine alleinige oder zusätzliche Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PDTC wirken sich auf die *Pgc-1 α* -Expression im Skelettmuskel aus

PGC-1 α ist ein sogenannter „Trainingsmarker“. Das entsprechende Gen wird in Antwort auf ein Ausdauertraining verstärkt exprimiert. Das PGC-1 α -Protein steuert den muskulären Metabolismus und die mitochondriale Biogenese (Li *et al.*, 2011; Übersicht bei Wang und Pessin, 2013).

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen war die *Pgc-1 α* -Expression weder auf RNA- noch auf Proteinebene in Antwort auf ein mehrwöchiges Lauftraining verändert.

Dies widerspricht verschiedenen Angaben in der Literatur, die nach einem Ausdauertraining einen signifikanten Anstieg der PGC-1 α -Konzentration im murinen Skelettmuskel notierten (Feng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; White *et al.*, 2008). Diese divergierenden Ergebnisse könnten verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit besteht darin, dass das im Rahmen der vorliegenden Studie verwendete Lauftraining (24 cm/s, entspricht 14,4 m/min, über 60 Minuten, drei Mal die Woche, zehn Wochen lang) nicht intensiv genug war, um eine (dauerhafte) Induktion der *Pgc-1 α* -Expression zu bewirken. Zwar wählten viele Studien bei Maus-Laufbandexperimenten ebenfalls eine Geschwindigkeit von umgerechnet 15 m/min, worauf in De Bono *et al.* (2006) verwiesen wird, jedoch zeigten Allen *et al.* (2001) in ihren *voluntary wheel running*-Experimenten, dass Mäuse durchaus freiwillig und ohne Probleme eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 26,4 m/min erreichen und dabei eine Strecke von 6,8 km/d zurücklegen konnten. In diesen Studien stand den Mäusen ein Laufrad im Käfig zur freiwilligen Bewegung zur Verfügung. So wäre zu überlegen, ob in weiteren Studien eine höhere Trainingsgeschwindigkeit gewählt werden müsste, um deutlichere Effekte zu erreichen. De Bono *et al.* (2006) stellten zudem in ihren *voluntary wheel running*-Experimenten fest, dass die Mäuse in keinem Versuch freiwillig eine längere Strecke am Stück ohne Pause absolvierten. Alle Mäuse wählten kurze, intensive Laufeinheiten, welche nach einer Dauer von 150 Sekunden jeweils für kurze Zeit unterbrochen wurden. Die Autoren postulieren auf dieser Basis, dass möglicherweise die meisten in der Literatur verwendeten Laufband-Protokolle, die ein Laufen mit moderater, konstanter Geschwindigkeit über einen längeren Zeitraum vorsehen, schlecht an das natürliche Laufverhalten der Mäuse angepasst seien. Somit wäre gegebenenfalls mit Intervall-Trainingsprotokollen ein besserer Trainingseffekt zu erreichen.

Anhand von Tests der „*endurance capacity*“ könnte zudem die Intensität des Ausdauertrainings in zukünftigen Studien nachgewiesen werden (Meek *et al.*, 2009).

Außerdem ist zu bedenken, dass bereits die untrainierten Tiere hohe Aktivitätslevel aufwiesen. Dieses Verhalten wird durch die Ergebnisse verschiedener *voluntary wheel running*-Experimente mit Mäusen, wie teilweise bereits beschrieben, untermauert. Die dabei verwendeten C57BL/6-Mäuse liefen in drei Tagen freiwillig Distanzen von ca. 16 km (Goh und Ladiges, 2015) oder in anderen Experimenten sogar im Schnitt 6,8 km/d (Allen *et al.*, 2001). Durch diese bereits hohe, freiwillige körperliche Aktivität kommt es vermutlich schon zu Anpassungen im Organismus der eigentlich untrainierten Tiere. Somit kristallisieren sich mögliche Unterschiede zwischen „Trainierten“ und „Untrainierten“ vermutlich weniger stark heraus als dies der Fall wäre, wenn sich die untrainierten Tiere in vollständiger körperlicher Inaktivität befänden.

Auch das Geschlecht der Tiere könnte eine Rolle spielen. So zeigten De Bono *et al.* (2006) selbst und verwiesen zusätzlich auch auf andere Studien mit demselben Ergebnis, dass weibliche Tiere freiwillig weitere Strecken absolvieren und eine höhere Laufgeschwindigkeit erreichen als vergleichbare männliche Tiere. Auch die entsprechenden Anpassungen an Herz- und Skelettmuskulatur fielen in diesen Studien dementsprechend bei den weiblichen Tieren signifikanter aus. Möglicherweise wären auch die Ergebnisse dieser Arbeit bei der Verwendung weiblicher Mäuse anders ausgefallen. Jedoch konnte auch bei den männlichen Tieren eine stetige Laufbereitschaft beobachtet werden. Zudem wurden hormonelle Schwankungen, die die Ergebnisse teilweise hätten verfälschen bzw. variieren können, ausgeschlossen. Letzteres war bei der Planung der hier beschriebenen Studie der Hauptgrund für die Wahl männlicher Tiere gewesen.

Schließlich ist auch festzuhalten, dass es sich bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Trainingsform vermutlich um keinen reinen Ausdauerreiz handelte. Der Grund dafür könnte in der Steigung, dem „Bergauflaufen“, liegen. Dies lässt sich aus den phänotypischen Veränderungen der trainierten Tiere schließen, welche im Vergleich zu den untrainierten Mäusen eine stärker ausgeprägte Skelettmuskulatur in den Hintergliedmaßen, insbesondere im *M. vastus lateralis*, im Vergleich zu den untrainierten Tieren aufwiesen. Diese Hypertrophie gilt als Indiz für einen vermutlich ebenfalls vorliegenden Krafttrainingsreiz in dieser Trainingsstudie. Es handelt sich bei diesen Beobachtungen um präliminäre Ergebnisse, welche jedoch noch weitere interessante Forschungsfragen, wie z. B. den Nachweis von *fiber type switches* im Hinblick auf ein Krafttraining, aufwerfen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin keine Effekte der PDTC-Behandlung auf die *Pgc-1 α* -Expression beobachtet, weder in den Tieren mit noch in den Tieren ohne ein Laufband-

training. Es konnte lediglich die Tendenz einer höheren *Pgc-1 α* -Expression bei den PDTC-behandelten „Nichtläufern“ gegenüber den behandelten „Läufern“ erkannt werden. Diese Tendenz konnten Feng *et al.* (2013) in ihrer Studie mit signifikanten Ergebnissen belegen. Die Tiere absolvierten dabei ein achtwöchiges Laufbandtraining und erhielten intraperitoneal eine Dosis von 50 mg/kg PDTC. Die Autoren stellten in den behandelten untrainierten Tieren einen Anstieg der *Pgc-1 α* -Expression, in den trainierten behandelten Tieren dagegen eine Reduktion fest. Die Ursachen hierfür sind vermutlich in den komplexen Wechselwirkungen zwischen NF- κ B-Aktivität und Trainingsanpassung sowie insbesondere in der Tatsache zu suchen, dass PDTC neben dem NF- κ B-Weg auch Effekte auf andere Signaltransduktionswege ausübt (Feng *et al.*, 2013).

Die Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Wirkung der NF- κ B-Hemmung auf die *Pgc-1 α* -Expression beobachtet werden konnte, könnte schließlich, wie bereits in Abschnitt 5.1.3 erwähnt, ihre Ursache in einer zu geringen NF- κ B-Hemmung haben.

5.1.5.2 Das *Traf6*-Expressionsniveau wird weder durch ein Lauftraining noch durch die Gabe von PDTC beeinflusst

TRAF6 ist als Adaptorprotein an der Signaltransduktion über die Toll-/IL-1 und TNF-Rezeptorfamilie und damit in die Regulierung der Apoptose sowie Immun- und Entzündungsreaktion involviert (Bradley und Pober, 2001; Paul *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2004). Es ist zudem zentral an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt (Übersicht bei Kumar *et al.*, 2012). Bei kachektischen Erkrankungen ist fast immer die Konzentration proinflammatorischer Zytokine erhöht, welche verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die TRAF6-induzierte NF- κ B-Aktivierung, welche zu einem Abbau der Skelettmuskulatur durch die Hemmung anaboler und die gleichzeitige Förderung kataboler Prozesse führt (Übersicht bei Jackman *et al.*, 2013; Moynagh, 2005; Übersicht bei Saini *et al.*, 2006). Da eine Kachexie unabhängig von der jeweiligen Grunderkrankung als negativer prognostischer Faktor gilt (Übersichten bei Argilés *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2008; Lenk *et al.*, 2010), stellte sich im Rahmen dieser Arbeit auch die Frage, ob der in vielen Studien nachgewiesene kachexieprotektive Effekt von körperlichem Training zum Teil über eine Hemmung der *Traf6*-Expression erfolgt. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe hatte sich zudem gezeigt, dass das *Traf6*-Gen in kultivierten Skelettmuskelzellen einer NF- κ B-Regulation unterliegt (Mueck *et al.*, 2011), was die Frage aufwarf, ob dies auch *in vivo* der Fall ist und falls ja, ob eine solche Regulation trainingsabhängig ist.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die TRAF6-Konzentration mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens auf Proteinebene und über ein *qPCR*-Verfahren die *Traf6*-Expression auf RNA-Ebene untersucht. Bei beiden Analysen konnten große interindividuelle Schwan-

kungen, aber keine regelmäßigen Veränderungen der *Traf6*-Expression in Antwort auf einen Trainingsreiz festgestellt werden. Diese Daten sprechen gegen eine zentrale Rolle des TRAF6-Proteins bei der Vermittlung des kachexiepräventiven Effekts von körperlichem Training.

Allerdings ist bekannt, dass die Aktivität des TRAF6-Proteins in einer Zelle letztendlich nicht nur über die Expression des entsprechenden Gens reguliert wird, sondern auch über verschiedene posttranslationale Modifikationen, insbesondere über eine spezifische Form der Polyubiquitinierung. Dabei wird unterschieden zwischen der sogenannten K63-Ubiquitinierung, welche Signaltransduktionswege reguliert und der K48-Ubiquitinierung, die dagegen üblicherweise zum Abbau der markierten Proteine durch das Proteasomsystem führt. Dabei ist TRAF6 selbst eine E3-Ubiquitin-Ligase, welche sich selbst und auch verschiedene Zielproteine ubiquitinieren kann (Übersicht bei Kumar *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009). Somit ist es möglich, dass TRAF6 durchaus an der Regulation muskelab-, -auf- und -umbauender Prozesse in Zusammenhang mit körperlichem Training beteiligt ist, dass aber diese Regulation nicht über eine differentielle Expression des *Traf6*-Gens erfolgt.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die fehlende Regulation des *Traf6*-Gens durch körperliches Training könnte eine funktionelle Redundanz zwischen TRAF2 und TRAF6 sein: Paul *et al.* (2012) konnten nachweisen, dass TRAF2 und TRAF6 viele gemeinsame Eigenschaften haben, so z. B. bei der Aktivierung des *unfolded protein response* (UPR)-Signalwegs, welcher den Abbau fehlgefalteter Proteine einleitet. In weiterführenden Experimenten wäre es daher interessant, die *Traf2*-Expression in den im Rahmen dieser Studie gewonnenen Skelettmuskelproben zu untersuchen.

Denkbar ist schließlich auch in diesem Zusammenhang, dass der im Rahmen dieser Studie gesetzte Trainingsreiz nicht ausreichend war, um eine Regulation des *Traf6*-Gens zu erreichen (s. o.) oder dass die Regulation dieses Gens unter physiologischen Bedingungen anders als unter pathologischen (wie z. B. bei kachektischen Tieren, die bisher vor allem untersucht wurden) abläuft. Schließlich sind auch kinetische Effekte denkbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zudem keine Regulation des *Traf6*-Gens in Zusammenhang mit der Gabe von PDTC festgestellt werden, was gegen eine direkte Regulation der Expression dieses Gens durch NF- κ B im Skelettmuskel spricht. Dies ist aufgrund der Tatsache überraschend, dass zumindest laut einzelner Quellen (GeneCards; <http://www.genecards.org/>) eine Bindungsstelle für p65 im *Traf6*-Promotor postuliert wird. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es hier unter Dauerbehandlung zu weitreichenden Kompensations- und Anpassungsprozessen kommt. Allerdings war auch nach einer

akuten Trainingseinheit kein Effekt auf die TRAF6-Proteinkonzentration zu beobachten (s. 5.2.4.1). Hier sollten weiterführende Studien die genaue Kinetik der *Traf6*-Expression unmittelbar nach erfolgter PDTC-Behandlung klären.

5.1.5.3 Ein Lauftraining und/oder eine PDTC-Gabe wirken sich im *M. tibialis anterior* nicht auf das Expressionsniveau metabolischer und mitochondrialer Gene aus

Die Untersuchung der Expression verschiedener Markergene für metabolische Veränderungen und mitochondriale Anpassungsreaktionen, insbesondere der Gene *Sdh*, *Pdk4*, *Cpt1*, *Glut4* sowie *Ucp3*, *Cox4* und *Mb*, ergab im *M. tibialis anterior* keine signifikanten Effekte in Antwort auf einen Trainingsreiz oder eine NF- κ B-Hemmung. Dies war vor dem Hintergrund, dass in Antwort auf ein mehrwöchiges, regelmäßiges Lauftraining durchaus metabolische Veränderungen zu erwarten gewesen wären, erstaunlich. Auch NF- κ B, das ja in der hier beschriebenen Studie effektiv gehemmt wurde, stellt einen zentralen Regulator metabolischer Prozesse dar, sodass auch hier entsprechende Effekte wahrscheinlich gewesen wären.

Ein Erklärungsansatz könnte die Art des untersuchten Muskels sein, insbesondere seine Lokalisation und die damit einhergehende Belastung: Der *M. tibialis anterior* liegt, wie der Name erkennen lässt, leicht lateral der Tibia auf. Er unterstützt die Dorsalflexion der Hintergliedmaße, insbesondere des Sprunggelenks. Zudem stabilisiert er das Sprunggelenk beim Aufsetzen der Hintergliedmaße während des Laufens (Charles *et al.*, 2016). Er ist bei einem Lauftraining somit weniger aktiviert als z. B. der *M. vastus lateralis*. Dadurch sind möglicherweise beim *M. tibialis anterior* keine phänotypischen Veränderungen und eventuell auch weniger metabolische und mitochondriale Anpassungen unter der verwendeten Belastungsintensität zu beobachten.

Zum anderen könnte die fehlende Reaktion an der fasertypspezifischen Zusammensetzung des untersuchten Muskels liegen: Der *M. tibialis anterior* hat einen hohen Anteil schneller, ermüdungsresistenter, überwiegend oxidativer, nur teilweise glykolytischer Fasern und weist eine geringe Anzahl langsamer, oxidativer Fasern auf (Ariano *et al.*, 1973). Interessanterweise waren bei weiterführenden, bisher unveröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am *M. gastrocnemius* der Tiere, welcher insbesondere aus schnellen, leicht ermüdbaren, überwiegend glykolytischen Fasern (Ariano *et al.*, 1973) aufgebaut ist, durchaus Effekte auf metabolischer und mitochondrialer Ebene zu beobachten. Somit könnte sich die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete fehlende „metabolische Anpassung“ dahingehend erklären lassen, dass das entsprechende Potential der im *M. tibialis anterior* primär untersuchten Typ IIa-Fasern vergleichsweise gering ist.

Aufgrund der Tatsache, dass pro Tier jeweils nur ein Teil des gesamten Muskels untersucht wurde, könnte die Analyse der metabolischen Anpassungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch durch den jeweiligen untersuchten Anteil des *M. tibialis anterior* beeinflusst worden sein: Die oxidative Enzymaktivität des Muskels nimmt von der Oberfläche des Muskels zur Tiefe hin zu, wodurch in Abhängigkeit von der untersuchten Muskelregion unterschiedliche Anpassungsreaktionen in Antwort auf ein Training möglich sind (Augusto *et al.*, 2004; Ishihara *et al.*, 2002). So beobachteten Ishihara *et al.* (2002), dass nach freiwilligem Laufen in einem Laufrad die superfizielle Muskelregion des *M. tibialis anterior* Veränderungen im Metabolismus und in der Faserverteilung als Anpassung an die körperliche Aktivität zeigte, während die tiefen Muskelregionen keine Veränderungen aufwiesen. Die interindividuell relativ stark variierenden Ergebnisse in Bezug auf die Expression metabolischer und mitochondrialer Markergene in der vorliegenden Studie könnten somit möglicherweise auf die Untersuchung unterschiedlicher Muskelregionen des *M. tibialis anterior* hindeuten. Bei den Tieren, bei denen fast gar kein Effekt zu sehen war, lässt sich vermuten, dass hierbei insbesondere tiefe Muskelregionen des *M. tibialis anterior* entnommen und untersucht worden sind, welche von vornherein eine hohe oxidative Enzymaktivität und somit nur eine geringe „oxidative“ Anpassung aufweisen.

Denkbar wäre auch, dass die Ausdaueranpassung der Tiere verstärkt auf kardiovaskulärer Ebene stattfinden könnte. So stellten Allen *et al.* (2001) in ihren *voluntary wheel running*-Versuchen fest, dass es zu Veränderungen in der kardialen Genexpression und zu einer deutlichen kardialen Hypertrophie kam, jedoch zeitgleich die Hintergliedmaßen keine erkennbare Anpassung aufwiesen. Zudem ist auch zu beachten, dass der Metabolismus der Tiere trotz genetischer Homogenität (Inzuchtstamm) vermutlich auch durch individuelle Unterschiede in Bezug auf die Nahrungsaufnahme, dem ungesteuerten Aktivitätslevel („*voluntary activity*“) sowie dem Körpergewicht beeinflusst wird.

Wie oben bereits dargestellt wurde, besteht schließlich die Möglichkeit, dass der Umfang des von den Tieren absolvierten Trainings in Relation zu ihrem natürlichen Aktivitätsniveau so gering war, dass Unterschiede zwischen trainierenden Tieren und „Kontrollen“ nicht mehr nachweisbar waren.

In Bezug auf die fehlende „metabolische Reaktion“ auf eine PDTC-Behandlung könnten, wie in den vorangehenden Abschnitten bereits diskutiert, insbesondere Dosis- und Kompensationseffekte eine Rolle spielen.

5.1.5.4 Es lassen sich keine Auswirkungen eines Lauftrainings und/oder einer PDTC-Gabe auf die Expression von *Myostatin* feststellen

Myostatin (MSTN) fungiert als negativer Wachstumsregulator des Muskelgewebes. Das entsprechende Gen wird vorwiegend in der Skelettmuskulatur exprimiert. Die MSTN-Konzentration in Muskelgewebe und Serum ist im Rahmen von Skelettmuskelatrophien sowie chronischen, mit Kachexie einhergehenden Erkrankungen erhöht (Gu *et al.*, 2016). MSTN fungiert zudem als Schlüsselmediator zwischen Metabolismus und Ausdauerkapazität des Skelettmuskels (Mouisel *et al.*, 2014).

Im Rahmen der hier durchgeführten Tierstudie konnten keine signifikanten Effekte des Lauftrainings auf die Expression von *Mstn* festgestellt werden. Tendenziell erschien die *Mstn*-Expression bei den trainierten Tieren sogar erhöht.

In der Literatur sind die Ergebnisse verschiedener humaner Studien, die den Einfluss von Training auf die *Mstn*-Expression in Herz- und Skelettmuskel untersuchten, widersprüchlich und von der Art des Trainings abhängig. So zeigten Kopple *et al.* (2007) eine *Mstn*-Reduktion nach einem Ausdauertraining. Jedoch konnte in einer Studie von Coffey *et al.* (2006) festgestellt werden, dass es bei ausdauertrainierten Probanden nach einem wiederholten, einzelnen Trainingsreiz zu einer Induktion der *Mstn*-Expression kommen kann. Die Autoren vermuten vor diesem Hintergrund, dass die sportliche Vorerfahrung einen Einfluss auf die Regulation des *Mstn*-Gens haben könnte.

Allgemein sollte die Übertragung von Tiermodellen auf humane Studien und umgekehrt nicht eins zu eins erfolgen, da die Regulationsmechanismen so komplex sind, dass diese spezies-spezifisch variieren können. Zudem sind die humanen Probandenkollektive deutlich heterogener als das entsprechende Tiermodell, sodass Unterschiede im Ergebnis zu erwarten sind (Übersicht bei Mueller *et al.*, 2016).

Möglicherweise könnte der Organismus durch eine Induktion der *Mstn*-Expression bei mehreren Trainingseinheiten eine „überschießende“ Muskelanpassung verhindern. Da ein kleinerer Muskel für seine Bewegungsabläufe weniger Sauerstoff benötigt, könnte eine *Mstn*-Hochregulierung während des Trainings auch als eine mögliche vorbeugende Energieeinsparmaßnahme des Skelettmuskels angesehen werden (Mouisel *et al.*, 2014). Zudem spielt MSTN eine wichtige Rolle bei der Anpassung des Skelettmuskels an körperliche Aktivität. Es führt zu einer hohen oxidativen Kapazität sowie einer geringen Ermüdbarkeit und verbessert dadurch die Ausdauerfähigkeit des Skelettmuskels, indem es ein Gleichgewicht zwischen Muskelmasse, Muskelkraft, Energiemetabolismus und Ausdauerkapazität herstellt. Zusätzlich reguliert *Mstn* den oxidativen Metabolismus über PPAR-Targetgene wie *Pgc-1 α* und *Cox4* (Mouisel *et al.*, 2014). Somit wäre es möglich, dass erhöhte MSTN-Konzentrationen in

Zusammenhang mit der Anpassung an bestimmte Formen des Ausdauertrainings durchaus sinnvoll sein könnten.

Die regulatorische Region des *Mstn*-Gens enthält DNA-Bindungssequenzen für mehrere Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören die bereits zuvor aufgeführte PPAR-Transkriptionsfaktorenfamilie, aber auch NF- κ B. Somit wurde vermutet, dass NF- κ B die Expression von *Mstn* während der Muskelwachstumsregulation beeinflusst (Ma *et al.*, 2001). Daher überrascht es insbesondere, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Hemmung von NF- κ B nicht zu einer veränderten *Mstn*-Expression geführt hat.

Erklärungsmöglichkeiten könnten wiederum Dosis- und/oder kompensatorische Effekte sein. Zudem ist anzunehmen, dass die Regulation der *Mstn*-Genexpression insbesondere *in vivo* zahlreichen, sich teilweise wechselseitig beeinflussenden Effekten unterliegt, welche wiederum durch PDTC in unterschiedlicher Art und Weise beeinflusst werden.

5.1.5.5 Ein Lauftraining und/oder eine Hemmung von NF- κ B wirken sich im *M. tibialis anterior* moderat auf die Expression der für die Myosine *MyH1*, *MyH2* und *MyH7* kodierenden Gene aus

Bei der Anpassung des Skelettmuskels an körperliches Training spielt insbesondere die differentielle Expression der *MyHC*-Gene eine entscheidende Rolle, welche für „schnelle, glykolytische“ und „langsame, oxidative“ Isoformen des MyHC-Proteins kodieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Gene *MyH1*, *MyH2* und *MyH7* analysiert. Dabei zeigten sich bezüglich des Expressionsniveaus der Gene *MyH1* und *MyH2*, welche für „schnelle“ und intermediäre MyHC-Isoformen kodieren, kaum Effekte in Antwort auf ein Training. *MyH7*, welches hauptsächlich in „langsamen“ Typ-I-Fasern vorkommt, war jedoch erwartungsgemäß tendenziell bei den „Läufern“ gegenüber den „Nichtläufern“ verstärkt exprimiert.

Die verstärkte *MyH7*-Expression in Antwort auf das Training liegt nahe, wenn man davon ausgeht, dass dieses primär einen „Ausdauerstimulus“ setzt. Die Beobachtung, dass sich durch ein Ausdauertraining der Muskelfasertyp hin zu einem langsam kontrahierenden, ausdauernden und ermüdungsresistenten Typ I entwickelt, ist in zahlreichen Studien beschrieben (Übersichten bei Hoppeler *et al.*, 2011; Steinacker *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 1994). Interessanterweise besteht der *M. tibialis anterior* bei untrainierten Nagetieren durchschnittlich nur zu 4 % aus *slow oxidative fibers*, d. h. den sogenannten Typ I-Fasern, und stellt somit, wie die meisten murinen Muskeln, einen eher „schnellen“ Muskel dar (Ariano *et al.*, 1973). Daher ist es möglich, dass die Anpassungsmöglichkeiten in Hinblick auf einen Trainingsreiz, der eher im Ausdauerbereich liegt, gering sind. Die oben beschriebenen Studien

beziehen sich hauptsächlich auf Ergebnisse des humanen Skelettmuskels. Von diesen ist bekannt, dass sie allgemein ein recht ausgeglichenes Verhältnis von Typ I- und Typ II-Muskelfasern aufweisen (Kho *et al.*, 2006). Zudem ist, wie oben beschrieben, unklar, inwieweit das im Rahmen dieser Arbeit von den Tieren absolvierte Lauftraining tatsächlich einen Trainingsreiz primär im Ausdauerbereich darstellt.

Die Medikation mit dem NF- κ B-Inhibitor PDTC bewirkte in der Studie dieser Arbeit dagegen eine zum Lauftraining gegenläufige Reaktion, d. h. *MyH7* war bei den trainierten Tieren tendenziell niedriger exprimiert als bei den untrainierten. Die *MyH1*- und *MyH2*-Expression zeigten dagegen keine Veränderungen durch eine PDTC-Applikation.

In der Literatur sind einzelne Studien aufgeführt, welche den Zusammenhang zwischen NF- κ B und der *MyH*-Genexpression untersuchen. Insbesondere konnten McFarlane *et al.* (2006) einen direkten Zusammenhang zwischen einer TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung und einer reduzierten Expression der *MyHs* nachweisen. Johnson und Pober (1994) konnten zudem zeigen, dass das für MHC-I kodierende Gen κ B-Bindungsstellen aufweist. Die *MyH7*-Expression in der Studie der vorliegenden Arbeit zeigte ebenfalls eine NF- κ B- bzw. PDTC-abhängige Regulation.

Um die Faserstruktur des Skelettmuskels der Tiere noch genauer analysieren zu können, wären weitere Laboruntersuchungen wie z. B. eine Fasertypisierung denkbar. Beispielsweise könnte man die relative Menge der einzelnen MyHCs anhand einer Gelelektrophorese mit SDS-Polacrylamid und einer Silberfärbung quantifizieren. Zudem wäre die Anfertigung von Kryoschnitten des Skelettmuskels und einer anschließenden sogenannten ATPase-Färbung möglich. Hierbei erfolgt die Muskelfasertypisierung über einen histochemischen Aktivitätsnachweis der myofibrillären Adenosintriphosphatase (mATPase).

5.1.5.6 Ein Lauftraining und/oder eine PDTC-Gabe wirken sich teilweise auf die Expression von Genen aus, die für sarkomerassoziierte Proteine kodieren

Bei der Anpassung an körperliches Training spielt die Umordnung von Sarkomeren und die Modulation der Sarkomerstruktur eine entscheidende Rolle. Dabei kann sich die Zusammensetzung des Sarkomers ändern, wobei molekulare Chaperone die präzise Faltung und den Zusammenbau der entsprechenden Proteine veranlassen (Gazda *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Expressionsveränderungen von *Actn3*, *skNac* und *Smyd1* untersucht.

ACTN3 sorgt durch die Verbindung von Aktin mit anderen Proteinen für die Stabilität der Aktinfilamente bei der Kontraktion des Skelettmuskels (Papadimitriou *et al.*, 2016). *Actn3* wird ausschließlich in schnell kontrahierenden, glykolytischen Muskelfasern exprimiert. Seine

Expression wird daher vorrangig durch Sprints und Krafttraining, jedoch weniger durch Ausdauertraining, induziert (Papadimitriou *et al.*, 2016). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten keine trainingsinduzierte Modulation der Expression des *Actn3*. Ein Grund hierfür könnte sein, dass das durchgeführte Trainingsprogramm eher einem Ausdauer- als einem Krafttraining entsprach.

Molekulare Chaperone haben eine wichtige Funktion bei Um- und Abbauprozessen von Proteinen und Proteinkomplexen. Im Skelettmuskel haben sie im Bereich der Sarkomere die Aufgabe, für eine präzise Faltung und einen korrekten Zusammenbau der am Aufbau des Sarkomers beteiligten Proteine zu sorgen (Du *et al.*, 2008; Gazda *et al.*, 2013).

Die für skNAC und seinen Interaktionspartner SMYD1 kodierenden Gene werden vor allem im quergestreiften Muskelgewebe exprimiert und spielen eine Schlüsselrolle bei der Myogenese. Nach heutigem Kenntnisstand spielt der skNAC-SMYD1-Komplex eine zentrale Rolle bei der Sarkomerogenese und der Fasertypspezifikation (Berger *et al.*, 2012).

Das Genexpressionsniveau von *skNac* und *Smyd1* wurde jedoch weder durch ein mehrwöchiges Lauftraining noch durch eine Hemmung von NF- κ B signifikant beeinflusst. Gründe hierfür könnten sein, dass ein massiver Sarkomerumbau eher in Reaktion auf ein Akuttraining stattfindet. Zu einer möglichen Regulation der *skNac*- oder der *Smyd1*-Expression durch NF- κ B existieren bisher keine Daten und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben keinen Hinweis auf einen solchen Zusammenhang.

Neben den Sarkomer-Strukturproteinen und den sarkomerassoziierten Chaperonen spielen bei muskulären Anpassungsreaktionen auch Proteine eine Rolle, die fehlgefaltete und denaturierte Proteine abbauen bzw. diese ihrem Abbau zuführen. Hier sind insbesondere die muskelspezifischen E3-Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 und MURF-1 zu nennen, welche beim Muskelabbau eine bedeutende Rolle spielen und insbesondere bei Muskelatrophien in erhöhter Konzentration vorliegen (Übersichten bei Foletta *et al.*, 2011; Bodine und Baehr, 2014; Al-Nassan *et al.*, 2012). Deswegen wurden diese beiden Marker auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass *Atrogin-1* bei den „Nichtläufern“ signifikant höher exprimiert war als bei den „Läufern“. Dieses Ergebnis entspricht den wenigen vorhandenen Daten in der Literatur. Hier wurde in verschiedenen Studien ebenfalls beobachtet, dass *Atrogin-1* bei „Untrainierten“ höher exprimiert war als bei „Trainierten“. Durch ein sechswöchiges Laufbandtraining (sechs Tage die Woche, 60 Minuten, 18 m/min) konnte die *Atrogin-1*-Expression signifikant verringert werden (Al-Nassan *et al.*, 2012). Auf Proteinebene konnte in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie dagegen keine signifikante Regulation von

Atrogin-1 nachgewiesen werden. Mögliche Gründe dafür könnten sein, dass die *qPCR* ein sensitiveres Verfahren als die *Western Blot*-Methode darstellt. Zudem könnten sich aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit der *Atrogin-1*-mRNA (Sacheck *et al.*, 2004) und möglicherweise einer deutlich längeren Halbwertszeit des Proteins entsprechende Effekte auf Proteinebene nivellieren.

Nach einer Hemmung von NF- κ B mittels PDTC wurden hingegen *Atrogin-1*-Expressionsniveaus wie bei trainierten Kontrolltieren festgestellt, unabhängig davon, ob ein Training absolviert worden war oder nicht. Dies deutet einen Zusammenhang zwischen NF- κ B und der *Atrogin-1*-Genexpression an.

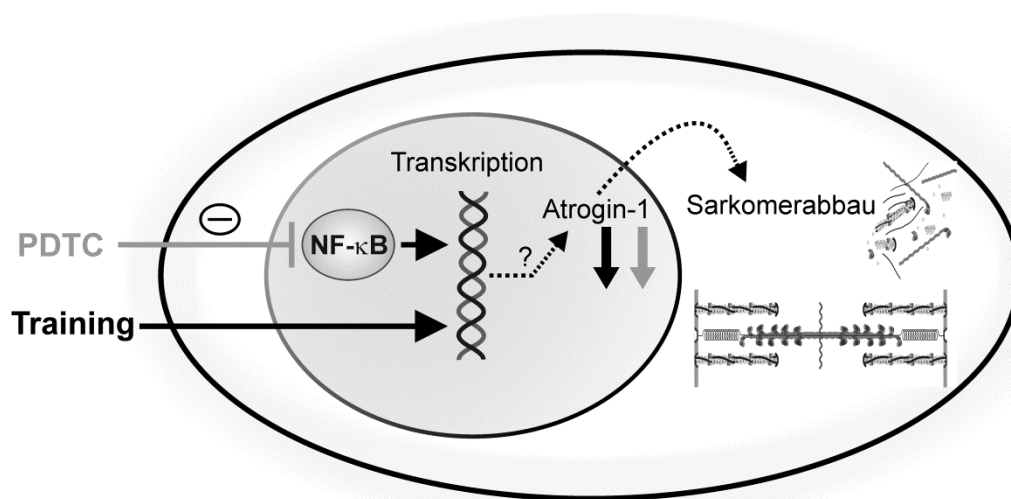


Abb. 28: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Training, PDTC-Gabe und *Atrogin-1*-Expression

Sowohl ein Training als auch eine NF- κ B-Hemmung durch PDTC verringern die Expression von *Atrogin-1*. Dieses spielt im Rahmen muskulärer Anpassungs- und Degenerationsprozesse eine wichtige Rolle, indem es fehlgefaltete und denaturierte Sarkomerproteine dem Abbau zuführt. Zudem ist die *Atrogin-1*-Konzentration auch bei degenerativen Prozessen der Skelettmuskulatur erhöht.

Dieser Befund ist im Zusammenhang mit Muskelatrophien interessant: Hier korrelieren erhöhte NF- κ B-Aktivitäten mit einer verstärkten Expression von *Atrogin-1* und *Murf1*. Es wird dabei postuliert, dass *Atrogin-1* und *Murf1* direkte Zielgene des NF- κ B-Proteins p50 darstellen und sogenannte *κ B sites* innerhalb ihrer Promotoren aufweisen (Übersicht bei Bodine und Baehr, 2014). Jedoch zeigten wiederum Cai *et al.* (2004) zwar eine direkte Induktion der Transkription des *Murf1*-Gens durch NF- κ B, konnten jedoch keine direkte Induktion von *Atrogin-1* aufgrund einer NF- κ B-Aktivierung nachweisen. Sie schließen daraus, dass eine

NF- κ B induzierte Muskelatrophie somit keine Induktion von *Atrogin-1* voraussetzt. Jedoch scheinen häufig im Rahmen einer Muskelatrophie parallele Signalwege von NF- κ B-Aktivierung und Induktion von *Atrogin-1* aktiviert zu werden (Cai *et al.*, 2004). In Einklang mit diesen Daten war in der zugrundeliegenden Studie der vorliegenden Arbeit die *Atrogin-1*-Expression, zumindest in den inaktiven Tieren, nach einer PDTC-Behandlung vermindert, was für eine NF- κ B-abhängige Regulation der *Atrogin-1*-Expression spricht. Zudem ist es möglich, dass PDTC auch über NF- κ B-unabhängige Signalwege wirkt.

Aufgrund der Literaturdaten überrascht es, dass in der vorliegenden Arbeit die Expression des *Murf1*-Gens, im Gegensatz zur *Atrogin-1*-Expression, in den „Trainierten“ nur leicht vermindert war. Allerdings wird auch in atrophischen Prozessen eine stärkere Induktion von *Atrogin-1* gegenüber *Murf1* beschrieben (Cai *et al.*, 2004). Zudem wird *Atrogin-1* sehr früh in atrophischen Geschehen hochreguliert (Gomes *et al.*, 2001). Diese Befunde sprechen für eine insgesamt stärkere „Regulierbarkeit“ der *Atrogin-1*- im Vergleich zur *Murf1*-Expression. Obwohl *Murf1* und *Atrogin-1* bei Atrophien beide verstärkt exprimiert werden, scheint zudem ihre Induktion über unterschiedliche Signalwege zu erfolgen (Übersicht bei Yang *et al.*, 2015). Diese Befunde könnten die differierenden Ergebnisse in Bezug auf die Regulation dieser beiden Markergene im Rahmen der vorliegenden Arbeit erklären.

Auch die fehlende Reaktion der *Murf1*-Expression auf die NF- κ B-Inhibition ist erstaunlich, gilt *Murf1* in anderen Studien doch als direktes Zielgen von NF- κ B (Cai *et al.*, 2004). Gründe dafür könnten eine für dieses *Target* zu schwache NF- κ B-Hemmung oder ein zu geringer Trainingsreiz sein. Zudem wird die *Murf1*-Genexpression nicht nur über NF- κ B reguliert, sondern auch über andere Signalwege wie z. B. die *forkhead transcription factors* oder die Glukokortikoidrezeptoren (Übersicht bei Bodine und Baehr 2014; Cai *et al.*, 2004), sodass hier interferierende Effekte denkbar sind.

Viele chronische Erkrankungen gehen mit einer Kachexie, d. h. einem Speicherfettdepotabbau begleitet von Muskeldegeneration, einher. Atrogin-1 und MURF1 beeinflussen dabei den Proteinhaushalt negativ und ihre Konzentration ist bei kachektischen Krankheitsbildern innerhalb kürzester Zeit deutlich erhöht. Die Hoffnung besteht darin, dass das bessere Verständnis der Wirkungsweise von Proteinen wie Atrogin-1 und MURF1 zu neuen therapeutischen Möglichkeiten bei Skelettmuskelatrophien führen könnte (Übersicht bei Foletta *et al.*, 2011; Al-Nasaan *et al.*, 2012). Deswegen gerieten diese beiden Proteine in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der klinischen Forschung. Allgemein gibt es im Zusammenhang mit präventiven und therapeutischen Ansätzen bei Skelettmuskelatrophien viele Studien, welche sich mit einer Auswirkung von akuten (Kraft-)Trainingseinheiten befasst haben (Al-Nasaan *et al.*, 2012; Übersicht bei Lenk *et al.*, 2010). Jedoch haben nur wenige die Aus-

wirkungen von Ausdauertraining in diesem Zusammenhang untersucht. Die in diesen Studien trainierten Probanden wiesen gegenüber den untrainierten Probanden ebenfalls geringere *Murf1*- und *Atrogin-1*-Konzentrationen auf und es waren insgesamt positive Trainingseffekte entgegen der Muskelatrophie zu beobachten (Al-Nassan *et al.*, 2012; Übersicht Lenk *et al.*, 2010).

Auch die in dieser Arbeit bei trainierten Tieren verminderte *Atrogin-1*-Expression würde somit die Hypothese bestätigen, dass Training als eine wirksame Gegenmaßnahme bei kachektischen Erkrankungen anzusehen ist.

5.2 Welche Effekte hat ein einmaliges „akutes“ Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität und wie erfolgt die Trainingsanpassung des Skelettmuskels unter NF- κ B-Inhibition?

Auch zur Rolle des NF- κ B-Signalwegs bei der Anpassung des Skelettmuskels an einen einmaligen, akuten Trainingsreiz fehlen systematische Untersuchungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst analysiert, wie sich ein einmaliges Laufbandtraining auf die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskelgewebe auswirkt. Da in verschiedenen Studien festgestellt werden konnte, dass die höchste NF- κ B-Aktivität zwei bis vier Stunden nach einer Trainingseinheit zu messen ist (Ji *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2012), wurden in dieser Arbeit die Hintergliedmaßen der Tiere drei Stunden nach der Trainingseinheit entnommen.

5.2.1 Die Tiere der „Akutgruppe“ zeigten während der Laufbandexperimente keine Auffälligkeiten, jedoch phänotypisch ein höheres Stresslevel als die „chronischen“ Mäuse

Die „Akutmäuse“ wirkten beim Handling durch Experimentatoren und Pflegepersonal deutlich gestresster als die „chronischen“ Mäuse. Die Stresssymptomatik steigerte sich, je weniger Tiere sich in einem Käfig befanden. Die möglichen Gründe dafür wurden bereits im Abschnitt 5.1.1 erläutert.

5.2.2 Wie wirkt sich ein einmaliges Lauftraining auf die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel aus?

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der I κ B- α -Proteinkonzentration im Skelettmuskel in Antwort auf ein einmaliges Lauftraining nachgewiesen werden.

Einen Anstieg von phosphoryliertem I κ B- α und somit eine gesteigerte NF- κ B-Aktivität nach einem akuten Laufbandtraining wurden in anderen Studien nachgewiesen (Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007; Ji *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2012). Die Funktion dieses trainingsbedingten Anstiegs der NF- κ B-Aktivität ist noch nicht erforscht. Jedoch ist denkbar, dass NF- κ B oxidativem Stress entgegenwirkt und den Muskel für weitere Trainingseinheiten gegenüber oxidativem Stress resistenter macht (Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007).

Des Weiteren könnte NF- κ B eine kurze, aber wichtige Entzündungsantwort induzieren, welche entscheidend für die Muskelregeneration nach einem Training sein könnte. Eine weitere Möglichkeit ist, dass NF- κ B durch die Induktion einer erhöhten Transkription des *IL-6*-Gens zu Veränderungen im muskulären Metabolismus nach körperlicher Betätigung führen könnte (Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007). Schließlich könnte NF- κ B eine Rolle bei apoptotischen Prozessen einnehmen (Ji *et al.*, 2004).

Unklar ist, warum im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen der I κ B- α -Konzentration in Antwort auf das Training beobachtet werden konnten. Ein Grund könnte der Zeitpunkt der Probenentnahme drei Stunden nach der Trainingseinheit sein: Kramer und Goodyear (2007) verweisen auf Studien in den gezeigt werden konnte, dass zwar die NF- κ B-Aktivität im murinen Skelettmuskel nach einer Trainingseinheit anstieg, die Phosphorylierung von I κ B- α jedoch schon während des Trainings ihr Maximum erreichte und nach der körperlichen Aktivität bereits wieder deutlich verringert war. In den murinen Laufbandexperimenten von Ji *et al.* (2004) lag insbesondere während und eine Stunde nach dem Training eine erhöhte Konzentration an phosphoryliertem und eine verringerte Konzentration an zytosolischem I κ B- α vor. Da phosphoryliertes I κ B- α direkt abgebaut wird, ist zu vermuten, dass Veränderungen der I κ B- α -Gesamtkonzentration ebenfalls während und kurz nach der akuten Trainingseinheit am wahrscheinlichsten zu beobachten gewesen wären. Auch Vella *et al.* (2012) konnten in ihren Experimenten am humanen *M. vastus lateralis* nachweisen, dass das NF- κ B-inhibitorische I κ B- α -Protein zwei Stunden nach einer Trainingseinheit signifikant reduziert war und sein Basallevel bereits wieder vier Stunden nach dem Training erreichte. Somit wäre es möglich, dass in der Studie dieser Arbeit bei einer früheren Entnahme des Muskels noch eine erhöhte I κ B- α -Proteinkonzentration nachweisbar gewesen wäre.

Ein weiterer möglicher Aspekt könnte, wie schon im Zusammenhang mit der mehrwöchigen Trainingsstudie diskutiert, die Tatsache sein, dass die Trainingsintensität möglicherweise zu moderat war. So wurden bei den Studien, die eine NF- κ B-Aktivierung nachweisen konnten, Geschwindigkeiten von 25 m/min über eine Stunde bzw. teilweise bis zur Erschöpfung erreicht (Ji *et al.*, 2004) oder die körperliche Aktivität erfolgte in Form eines Krafttrainings (Vella

et al., 2012). Auch wurden in diesen Studien andere Muskeln als der *M. tibialis anterior*, welcher im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, analysiert.

5.2.3 Konnte die NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel durch PDTC erfolgreich gehemmt werden?

Im nächsten Schritt wurde dann die NF- κ B-Aktivität durch eine intraperitoneale Injektion des Dithiocarbamats PDTC gehemmt und die Effekte dieser Hemmung auf die Trainingsanpassung des Skelettmuskels *M. tibialis anterior* analysiert.

Bei den „Akutmäusen“ konnte die PDTC-Gabe nicht über das Trinkwasser erfolgen, da dies für eine *steady state*-Konzentration vier Tage zuvor hätte erfolgen müssen. Dies hätte jedoch aufgrund der in dieser Zeit voraussichtlich stattfindenden kompensatorischen Anpassungen die Ergebnisse des Experiments möglicherweise verfälscht. Deswegen wurde der NF- κ B-Inhibitor bei den entsprechenden Gruppen zwei Stunden vor der Trainingseinheit intraperitoneal injiziert. Bereits in zahlreichen Studien zuvor wurde Mäusen PDTC intraperitoneal verabreicht, sodass in Bezug auf die Wahl der Dosis im Rahmen der hier beschriebenen Studie entsprechende Protokolle vorhanden waren. So injizierten Ji *et al.* (2004) und Sharma *et al.* (2011) 100 mg/kg, Strait *et al.* (2008) 80 mg/kg, Messina *et al.* (2006), Siegel *et al.* (2009) und Zhang *et al.* (2011) 50 mg/kg und Parodi *et al.* (2005) 20 mg/kg PDTC. Carlson *et al.* (2005) und Nai *et al.* (2007) testeten verschiedene Dosierungen mit 50 und 75 mg/kg bzw. 10, 50 und 100 mg/kg. Bei deutlich höheren Dosen wurden teilweise lokale Irritationen an der Einstichstelle beschrieben. Andere Nebenwirkungen, z. B. auf das ZNS, wurden erst nach einer Beobachtungszeit von mehreren Wochen festgestellt, was für das hier beschriebene Experiment irrelevant war, da die Behandlung einmalig erfolgte und die Tiere am gleichen Tag getötet wurden. Die LD₅₀ für die intravenöse Applikation beträgt laut Literaturangaben 282,4 mg/kg (Chabikovskiy *et al.*, 2010). Bei den Versuchen zu dieser Arbeit kam es bei intraperitonealer Applikation von 100 mg/kg bei den ersten drei Tieren zu drastischen Nebenwirkungen. Alle drei Tiere zogen sich zurück und zeigten folgende Symptome: gekrümmte Körperhaltung, gestäubtes Fell, geschlossene Augen, Dyspnoe, Lethargie bis hin zu sedativen Zuständen. Dieser Zustand besserte sich auch nach 15 Minuten nicht, sondern verschlechterte sich zunehmend, sodass aus tierschutzrechtlichen Gründen entschieden wurde, die Tiere zu euthanasieren. Da Verunreinigungen im PDTC, Applikations- und Konzentrationsfehler überprüft und ausgeschlossen werden konnten, wurde die Dosis auf 20 mg/kg verringert. Selbst hier traten die oben genannten Nebenwirkungen auf, allerdings in abgeschwächter Form und die Tiere erholten sich vollständig nach knapp 20 Minuten. Die in anderen Studien verwendeten, deutlich höheren Konzentrationen, für welche jedoch keine Nebenwirkungen beschrieben wurden, erscheinen in diesem Zusammenhang fraglich. Lediglich

Chabicoovsky *et al.* (2010) beschrieben genau die Nebenwirkungen, die auch bei den Experimenten zu dieser Arbeit beobachtet wurden, allerdings bei einer intravenösen Gabe von 200 mg/kg. Teilweise wurden die Tiere der anderen Studien im Anschluss an die PDTC-Gabe sediert, sodass die Nebenwirkungen möglicherweise maskiert wurden und damit unbemerkt blieben. Die im hier beschriebenen Versuch trotz niedrigerer Dosis aufgetretenen Nebenwirkungen zeigten jedoch keine Auswirkungen auf die anschließende Trainingseinheit: Es konnten keine Unterschiede im Verhalten oder in der Laufbereitschaft zwischen Tieren mit und ohne PDTC-Injektion beobachtet werden; die Tiere hatten sich offensichtlich innerhalb der zwei Stunden vollständig erholt, die zwischen i. p.-Injektion und Trainingsbeginn lagen.

Bei der anschließenden *Western Blot*-Analyse des Muskelgewebes war die Konzentration von I κ B- α bei den PDTC-behandelten Tieren zwar leicht, aber nicht signifikant erhöht. Somit konnte mit diesem Verfahren eine signifikante NF- κ B-Hemmung nicht nachgewiesen werden. Wie oben bereits erwähnt, liegt die Vermutung nahe, dass die Konzentration dem Zeitpunkt der Entnahme des Skelettmuskels geschuldet sein könnte. So ist laut verschiedener Autoren eine erhöhte Konzentration an phosphoryliertem und somit eine geringere Konzentration an unphosphoryliertem I κ B- α bereits während bzw. eine Stunde nach dem Training und dadurch deutlich früher messbar (Übersicht bei Kramer und Goodyear, 2007; Ji *et al.*, 2004). Die Hemmung der I κ B- α -Phosphorylierung durch PDTC findet somit vermutlich ebenfalls zu einem früheren Zeitpunkt, während oder kurz nach der Trainingseinheit, statt.

Die nachfolgend beschriebenen Genexpressionsstudien zeigten jedoch durchaus signifikante Effekte der PDTC-Behandlung. Dies könnte ihre Ursache darin haben, dass das gewählte Verfahren zur Quantifizierung der NF- κ B-Aktivität nicht sensitiv genug war oder dass der Entnahmezeitpunkt ungünstig gewählt war (s.o.). Zudem beeinflusst PDTC den NF- κ B-Signalweg nicht nur über eine Hemmung der Phosphorylierung von I κ B- α . PDTC kann ebenfalls direkt sensitive Thiolgruppen innerhalb der NF- κ B-Proteine oxidieren und diese dadurch inaktivieren. Außerdem kann es den NF- κ B-Signalweg, wie oben beschrieben, indirekt über die Beeinflussung der ROS-Konzentration und möglicherweise über eine Hemmung der Proteinkinase C steuern. Ebenso sind, aufgrund der Funktion des PDTCs als Antioxidans, auch NF- κ B-unabhängige Effekte denkbar: So ist PDTC z. B. in der Lage, mitochondriale Anpassungen in Antwort auf ein Ausdauertraining unabhängig von einer Beeinflussung der NF- κ B-Aktivität zu hemmen (Feng *et al.*, 2013; Mariappan *et al.*, 2010). Dies lässt für die nachfolgend beschriebenen, in dieser Studie beobachteten Effekte der PDTC-Behandlung auf das Genexpressionsmuster des *M. tibialis anterior* die Schlussfolgerung zu, dass diese

entweder auf I κ B- α -unabhängige, aber trotzdem NF- κ B-abhängige oder gänzlich NF- κ B-unabhängige Effekte zurückzuführen sind.

5.2.4 Wie wirken sich eine einmalige Akutbelastung sowie eine PDTC-Gabe auf Genexpressionsmuster im Skelettmuskel *M. tibialis anterior* aus?

Bei der Analyse der Genexpression auf RNA- und Proteinebene innerhalb dieses Versuchs- teils ist insgesamt anzumerken, dass die teilweise auftretenden hohen Standardabweichungen vermutlich auf eine Reihe versuchsimmanenter Charakteristika zurückzuführen sind: So spielten Stressfaktoren wie Rangkämpfe mit Artgenossen, das Entfliehen einer einzelnen Maus sowie das beschriebene, erhöhte Stresslevel beim *Handling* der Tiere, die in Einzelkä- figen saßen, vermutlich eine große Rolle. Auch die Injektion mit PDTC und die damit einher- gehenden Nebenwirkungen stellten bei den „Akutmäusen“ ein zusätzliches u. U. individuelles Stresspotenzial dar. Um die Variation bei den Muskelprobenentnahmen so gering wie mög- lich zu halten, wurde die Muskelpräparation mittels Binokular und von ein und derselben Person durchgeführt. Dies wirkte sich jedoch nachteilig auf die daraus resultierende, teilwei- se zeitversetzte Präparation bei den „Akutmäusen“ aus, sodass die Zeitpunkte der Proben- entnahme teilweise um bis zu 30 Minuten differierten. Dies stellt somit ebenfalls eine mögli- che Ursache interindividueller Schwankungen dar. Ein zeitversetztes Lauftraining der Tiere war nicht möglich, da die Geschwindigkeiten der einzelnen Laufbandbahnen nicht separat angesteuert werden konnten.

5.2.4.1 Weder eine einmalige Laufbelastung noch eine alleinige oder zusätzliche PDTC-Gabe wirken sich auf die PGC-1 α - sowie die TRAF6-Proteinkonzentration im Skelettmuskel aus

Bezüglich der Proteinkonzentrationen von TRAF6 und PGC1- α konnten im Rahmen dieser Arbeit im Vergleich „Läufer“ *versus* „Nichtläufer“ sowie PDTC-Behandlung *versus* NaCl- Behandlung keine signifikanten Unterschiede erkannt werden.

Feng *et al.* (2013) verweisen auf Ergebnisse anderer Studien, die zeigen konnten, dass die *Pgc-1 α* -Expression nicht nur nach einem Langzeittraining, sondern auch bereits nach einer Akutbelastung induziert wird. Die fehlende Induktion der *Pgc-1 α* -Expression auf Proteinebe- ne in Antwort auf einen einmaligen akuten Trainingsreiz in der Studie der vorliegenden Arbeit könnten sich wie bei den chronischen Tieren über einen zu geringen Trainingsreiz, die Trai- ningsform sowie das bereits hohe Aktivitätslevel der „Nichtläufer“ erklären lassen. Die Abwe- senheit einer PDTC-Reaktion könnte auf eine zu geringe NF- κ B-Hemmung oder auch auf andere beteiligte Signalwege hinweisen (s. 5.1.5.1).

Die Tatsache, dass auch die TRAF6-Konzentration in Antwort auf körperliche Betätigung bzw. die Applikation von PDTC nicht signifikant reguliert war, könnte wie bei den „chronischen“ Mäusen dafür sprechen, dass dieses Protein in die Regulation der Trainingsanpassung nicht involviert ist. Ein möglicher Grund könnte aber auch sein, dass die Gesamktivität des TRAF6-Proteins nicht nur über die Expression des entsprechenden Proteins und die hieraus resultierende Proteinkonzentration, sondern auch über eine spezifische Form der Polyubiquitinierung reguliert wird. Zudem gibt es Anhaltspunkte für eine funktionelle Redundanz zwischen TRAF6 und TRAF2 (s. 5.1.5.2).

Das in diesem Versuchsteil gewonnene Ergebnis in Bezug auf die TRAF6- und PGC-1 α -Proteinkonzentration deutet schließlich darauf hin, dass es unwahrscheinlich ist, dass TRAF6 und PGC-1 α bei der Trainingsanpassung nur akut reguliert werden und eine mögliche Regulation bei den „chronischen“ Tieren schon abgeklungen sein könnte, eine Hypothese, die man aus den bei den „chronischen Mäusen“ gewonnenen Daten hätte ableiten können (s. 5.1.5.2; 5.1.5.1).

5.2.4.2 Die Expression entzündungsassoziierter Gene wird durch eine Akutbelastung erhöht; durch die Gabe von PDTC wird dieser Effekt abgeschwächt

5.2.4.2.1 Eine Akutbelastung führt zu einer erhöhten Genexpression von *Il-6r*, welche durch eine PDTC-Behandlung reduziert wird

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, wirkt jedoch auch antiinflammatorisch, indem es die Produktion von TNF- α und IL-1 inhibiert (Übersicht Lenk *et al.*, 2010). Es liegt bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, aber auch bei einer akuten Entzündungsreaktion nach körperlicher Betätigung, neben IFN- γ und TNF- α , deutlich erhöht vor (Nedachi *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2001; Übersicht bei Saini *et al.*, 2006). Der Unterschied zwischen pathologischer Entzündung und physiologischer Reaktion auf einen Trainingsreiz besteht in der Dauer des Anstiegs der Zytokinkonzentration: IL-6 spielt nach einer Trainingseinheit eine wichtige Rolle für den Metabolismus und das Immunsystem und sinkt zwei Stunden nach einer körperlichen Betätigung wieder ab. Bei chronischen Entzündungen ist der IL-6-Spiegel stattdessen über Wochen oder Monate erhöht. Seine biologischen Aktivitäten führt IL-6 über den IL-6-Rezeptor aus. Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) bildet auf den Zielzellen mit dem Zelloberflächenrezeptor Gp130 ein Heterodimer, welches verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Der Gp130-Rezeptor übernimmt dabei die sogenannte „Signalübersetzung“ und ist in der Plasmamembran der meisten Zellen vorhanden (Übersichten bei Carson und Baltgalvis, 2010; Wolf *et al.*, 2014). Dies stellt den klassischen Signalweg von IL-6 dar. In einem zweiten Signalweg (*trans-signalling*) bindet IL-6 an lösliche Formen des IL-6R (sIL-6R). Dieser Komplex ist dazu in der Lage, alle Zellen, die *gp130* exprimieren, zu aktivieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *Il-6r*-Gen auf RNA-Ebene bei den un- behandelten, trainierten Tieren 2,5-mal höher exprimiert war als bei Untrainierten. Dieser trainingsbedingter Anstieg der *Il-6r*-Expression entspricht den Ergebnissen anderer, in der Literatur beschriebenen Studien. So zeigten Castellani *et al.* (2015), dass eine akute Trainingseinheit die Expression von *Il-6r* und *gp130* in Blut und Fettgewebe induziert und ein langfristiges Training die Konzentration der entsprechenden Proteine im murinen Skelettmuskel erhöht. Auch Keller *et al.* (2005) konnten nach einem akuten Training eine Induktion der für *Il-6r* und *Gp130* kodierenden Gene im humanen Skelettmuskel feststellen. Beiter *et al.* (2015) konnten zudem bei humanen Probanden, welche ein einstündiges Fahrradtraining absolviert hatten, einen signifikanten Anstieg der *Il-6r*-Expression im *M. vastus lateralis* beobachten. Exogenes IL-6 kann dabei seine eigene Produktion im aktiven Skelettmuskel aufrechterhalten, indem es die IL-6 mRNA stabilisiert und über eine positive Rückkopplungs-Regulation die IL-6-Signalwege fördert (Übersicht bei Beiter *et al.*, 2015).

Nach einer Medikation mit PDTC war dagegen keine Induktion des *Il-6r*-Gens durch die Laufbelastung mehr zu beobachten. Interessanterweise ist bekannt, dass NF- κ B die Expression von *Il-6* reguliert, welches eine bedeutende Rolle bei der Insulinresistenz und der Typ-2-Diabetes spielt (Coll *et al.*, 2010). Frühere Studien haben zudem ein Vorkommen von NF- κ B-Bindungsstellen an Promotorregionen von *Il-6* postuliert (Vella *et al.*, 2012). NF- κ B reguliert zudem die Expression von *Il-6* nach einem akuten Krafttraining über eine Steigerung der Transkription und stellt einen wichtigen Regulator inflammatorischer Signalwege nach körperlicher Aktivität dar (Vella *et al.*, 2012). Da IL-6 seine Aktivitäten insbesondere über den IL-6-Rezeptor ausführt und die Expression des entsprechenden Gens induzieren kann (Capomaccio *et al.*, 2011), ist zumindest eine indirekte Auswirkung von NF- κ B auf die *Il-6r*-Expression wahrscheinlich, was die in dieser Studie beobachtete fehlende trainingsvermittelte Induktion nach PDTC-Behandlung erklären könnte. Aufgrund der Tatsache, dass das IL-6/IL-6R-System eine wichtige Rolle bei der Trainingsanpassung des Skelettmuskels zu spielen scheint (Capomaccio *et al.*, 2011; Keller *et al.*, 2005), könnten sich hieraus Implikationen für mögliche Wechselwirkungen von Trainingstherapien und paralleler Medikation ergeben.

5.2.4.2.2 Die Expression von *Cxcl5* und *Egr1* ist nach einer Akutbelastung erhöht, der Effekt wird durch eine PDTC-Behandlung nivelliert

CXCL5:

CXCL5 reguliert die Homöostase der neutrophilen Granulozyten und stimuliert die Chemotaxis der Leukozyten im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens oder nach körperlicher Aktivität (Nedachi *et al.*, 2008; Craig *et al.*, 2009).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, unbehandelten Tieren war die *Cxcl5*-Expression auf RNA-Ebene nach einem Training tendenziell gegenüber den „Nichtläufern“ erhöht. Einen tendenziellen, jedoch ebenfalls nicht signifikanten Anstieg der CXCL-5-Konzentration nach einem Laufbandtraining im murinen Skelettmuskel konnten Nedachi *et al.* (2008) nachweisen. Auch in den Plasmaproben der murinen Probanden war der Trend hin zu einer erhöhten Konzentration an CXCL5 zu beobachten. Nedachi *et al.* (2008) setzten zudem C2C12-Zellen über 24 Stunden elektrischen Impulsen aus (EPS), was zu einem Kontrahieren der Zellen führte und ein stark vereinfachendes Modell der Muskelkontraktion darstellt. Die Zellkulturen wiesen im Anschluss höhere *Chemokine (cxc-motif) ligand 1* (CXCL1)- und CXCL5-Konzentrationen auf. Interessanterweise konnten für CXCL5 und CXCL1 in C2C12-Zellen Funktionen im Metabolismus auch im Zusammenhang mit einer Insulinempfindlichkeit bzw. -resistenz nachgewiesen werden (Nedachi *et al.*, 2008). Möglicherweise steigt die Expression von *Cxcl1* dabei schneller und stärker als die Expression von *Cxcl5* an, was auch erklären könnte, warum der in dieser Arbeit beobachtete Anstieg der *Cxcl5*-Expression eher moderat war und kein Signifikanzniveau erreichte. Hier wäre eine Analyse der *Cxcl1*-Expression in weiterführenden Studien interessant.

Nach einer parallelen Medikation mit PDTC war der Effekt einer erhöhten, trainingsinduzierten *Cxcl5*-Expression nicht mehr zu beobachten. Da NF- κ B nachgewiesenermaßen die *Cxcl5*-Expression reguliert, war ein Effekt des PDTCs auf die Expression dieses Gens im Rahmen dieser Arbeit zu erwarten gewesen: So beschrieben Craig *et al.* (2009), dass die für *Cxcl5* kodierende Gene NF- κ B-Bindungsstellen aufwiesen. In einem C2C12-Zellkulturmodell konnte zudem nachgewiesen werden, dass der Anstieg der CXCL5-Konzentration nach einer EPS-Stimulation der C2C12-Zellen hauptsächlich über den NF- κ B-Signalweg getriggert wird (Nedachi *et al.*, 2009). Die nach PDTC-Behandlung verringerte trainingsvermittelte Induktion der *Cxcl5*-Expression war in der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Studie jedoch nur als Trend und nicht statistisch signifikant nachweisbar. Möglicherweise wäre dieser Effekt auf kardialer Ebene deutlicher ausgefallen: Es ist bekannt, dass CXCL1 und CXCL5, vermittelt durch die NF- κ B-Aktivierung in Antwort auf

inflammatorische Signale, z. B. durch ein Training oder Entzündungsprozesse, insbesondere von kardialen Myozyten sezerniert werden (Nedachi *et al.*, 2008). Dies wird momentan in unserer Arbeitsgruppe genauer untersucht.

EGR-1:

Die Expression des für den Transkriptionsfaktor *Egr-1* kodierenden Gens wird u. a. durch Reize wie Hypoxie, Gewebsverletzungen oder Zytokine induziert (Gashler und Sukhatme, 1995). EGR-1 ist zudem bei einem Skelettmuskelverlust verstärkt aktiviert (Skorokhod *et al.*, 2012). EGR-1 hat bei akuten und chronischen pathologischen Prozessen wie z. B. Arteriosklerose, Entzündungsprozessen, ischämiebedingten Reperfusionsschäden oder Transplantat-Abstoßungen eine Schlüsselrolle inne. Es ist ein pleiotroper, inflammatorischer Transaktivator, der eine wichtige Funktion bei der Regulation von mehreren hundert Genen wie z. B. *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-6* oder auch *Tgf- β* hat (Chapman und Perkins, 2000; Schmidt *et al.*, 2008; Sukhatme *et al.*, 1988). Skorokhod *et al.* konnten 2012 zeigen, dass *Egr1* bei Vorgängen, die mit Muskelverlust einhergehen, deutlich induziert wird. Dies deutet eine Rolle von EGR1 bei der systemischen Entzündungsantwort des Skelettmuskels an.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tieren war nach einer Akutbelastung die *Egr-1*-Expression gegenüber den inaktiven Mäusen erhöht. Einen Anstieg von *Egr-1* nach körperlicher Betätigung wiesen auch McLean *et al.* (2015) nach. Bei den in ihrer Studie beschriebenen humanen Probanden konnte bereits 30 Minuten nach einem Fahrradtraining eine erhöhte *Egr-1*-Expression im *M. vastus lateralis* gemessen werden. Auch Neubauer *et al.* (2014) konnten in einer Studie mit humanen Probanden drei Stunden nach einer akuten Ausdauerbelastung einen Anstieg der EGR-1-Konzentration beobachten. Das Ausdauertraining belief sich in dieser Studie auf zwei Stunden und setzte sich aus einer Stunde Laufen und einer Stunde Fahrradfahren zusammen, was einem relativ intensiven Trainingsreiz entspricht. Ggf. könnte dieser Umstand, zusammen mit speziesspezifischen Unterschieden, die stärkeren Effekte im Vergleich zur vorliegenden Studie erklären.

Nach einer PDTC-Applikation konnte in der Studie der vorliegenden Arbeit keine Induktion durch eine Akutbelastung mehr nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die durch eine Akutbelastung vermittelte Induktion NF- κ B-abhängig ist. In der Literatur gibt es Hinweise, dass *Egr-1* NF- κ B-Bindungsstellen enthält (Zhou *et al.*, 2003). Jedoch konnte in früheren Studien für die Expression von *Egr-1* keine NF- κ B-Abhängigkeit nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2003). Es ist somit für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch denkbar, dass PDTC bei den Tieren, die ein Laufbandtraining absolviert haben, über den ROS-Signalweg zu einer Reduktion der *Egr-1*-Expression geführt hat.

5.2.4.3 Eine einmalige Laufbelastung führt tendenziell zu einer erhöhten Expression von mit Anti-Inflammation assoziierten Genen; dieser Effekt wird durch eine PDTC-Behandlung abgeschwächt wird

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit Effekte, sowohl der Laufbelastung als auch der PDTC-Behandlung, auf die Expression „proinflammatorischer“ Gene zu beobachten gewesen waren, wurden im Anschluss auch Effekte auf die Expression „antiinflammatorischer“ Gene untersucht. Diese Analyse ergab ebenfalls potentiell interessante Zusammenhänge.

5.2.4.3.1 Die Expression des *Zfp36*-Gens wird nach Laufbelastung unter PDTC-Behandlung signifikant reprimiert

ZFP36 kann die Expression von mit Inflammation assoziierten Genen sehr effizient und schnell kontrollieren, indem es die Halbwertszeiten der entsprechenden Transkripte beeinflusst. Durch diese post-transkriptionelle Kontrolle stellt es einen zentralen Regulator der muskulären Entzündungsantwort dar (Beiter *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit war die *Zfp36*-Expression im *M. tibialis anterior* nach Laufbelastung geringfügig, jedoch nicht signifikant, erhöht. In anderen Studien wurde dagegen von einem unmittelbaren, signifikanten Anstieg der *Zfp36*-Expression nach einem akuten Ausdauertraining berichtet. So konnten Beiter *et al.* (2015) sowohl im murinen *M. soleus* nach einem Ausdauertraining als auch im humanen *M. vastus lateralis* in Antwort auf ein einstündiges Fahrradtraining einen unmittelbaren, deutlichen Anstieg der *Zfp36*-Expression verzeichnen. Möglicherweise ist die Wahl des untersuchten Muskels für diese differierenden Ergebnisse verantwortlich: Der *M. tibialis anterior* weicht in seiner Aufgabe bei der Laufbewegung, seiner Lage und seiner Fasertypspezifischen Zusammensetzung z. B. deutlich vom *M. soleus* ab (s. Ausführungen 5.1.4.3).

In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie war die *Zfp36*-Expression nach einer PDTC-Applikation nach einer Laufbelastung sowohl gegenüber den unbehandelten Mäusen als auch gegenüber den behandelten, inaktiven Tieren signifikant reduziert. Diese Daten legen nahe, dass die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade oder ein anderer Signalweg, der durch PDTC reprimiert wird, für die Aufrechterhaltung der *Zfp36*-Expression unter Belastung, ggf. auch für ihre Induktion, verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass der *Zfp36*-Promotor über eine Bindungsstelle für NF- κ B verfügt (Beiter *et al.*, 2015). Zudem konnten Chen *et al.* (2013) nachweisen, dass NF- κ B die Transkription des *Zfp36*-Gens beeinflusst.

5.2.4.3.2 Die Expression von *Atf3* unterliegt starken Schwankungen, zeigt jedoch tendenziell einen trainingsbedingten Anstieg, welcher nach einer PDTC-Gabe abgeschwächt wird

ATF3 kann sowohl als transkriptioneller Aktivator oder Repressor wirken. Eine wichtige Rolle als Repressor nimmt das Protein im Rahmen von Entzündungsprozessen wahr, indem es diesen durch eine Hemmung der Expression verschiedener Gene, die für proinflammatorische Zytokine wie *Il-6* oder *Tnf- α* kodieren, entgegenwirkt (Übersicht bei Hai *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund großer interindividueller Unterschiede keine signifikanten Effekte der Laufbelastung und/oder der PDTC-Gabe auf die *Atf3*-Expression beobachtet werden.

Atf3 stellt ein Zielgen von NF- κ B dar und wird somit ebenfalls induziert, wenn NF- κ B aktiviert wird (Kwon *et al.*, 2015). Dies könnte den im Rahmen der vorliegenden Arbeit tendenziell beobachteten Anstieg der *Atf3*-Expression nach körperlichem Training, welcher durch eine PDTC-Behandlung abgeschwächt wurde, erklären. Zudem konnte in einer anderen Studie eine Induktion der *Atf3*-Expression nach einem zweistündigen Lauftraining im murinen *M. soleus* festgestellt werden (McKenzie und Goldfarb, 2007). Eine Induktion der *Atf3*-Expression nach einer akuten Trainingseinheit konnte auch in einer Studie mit humanen Probanden von McLean *et al.* (2015) nachgewiesen werden.

Gründe dafür, warum in der vorliegenden Arbeit keine lauf- oder PDTC-abgängige Regulation der *Atf3*-Expression zu beobachten war, könnten kinetische Effekte oder PDTC-Dosiseffekte sein. Zudem könnte wiederum der untersuchte Muskeltyp eine Rolle spielen.

5.2.4.3.3 Die *Maff*-Expression ist nach Akutbelastung erhöht, ein Effekt, der durch PDTC-Behandlung abgeschwächt wird

MAFF ist ein Mitglied der Familie der *small MAF transcription factors*. Es stellt einen wichtigen, aber noch nicht genau charakterisierten Mediator der oxidativen Stressantwort dar (Übersicht bei Kannan *et al.*, 2012; Bensellam *et al.*, 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit war die *Maff*-Expression nach einem einmaligen akuten Training bei den unbehandelten „Läufern“ gegenüber den unbehandelten „Nichtläufern“ 2,5-fach erhöht. In der Literatur gibt es humane Studien und Untersuchungen an Tiermodellen, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die *Maff*-Expression durch eine akute Belastung im Skelettmuskel induziert wird (Neubauer *et al.*, 2014; Pearen *et al.*, 2009). Dies ist wahrscheinlich nach einer Trainingseinheit wichtig, um dem entstandenen oxidativen Stress entgegenzuwirken. Die Rolle von *Maff* in diesem Zusammenhang wird darin deutlich, dass eine

Hemmung von *Maff* zu einer stark reduzierten Expression von Genen führt, die für antioxidative Faktoren kodieren (Bensellam *et al.*, 2015).

Interessant ist zudem die in der Literatur teilweise kontrovers geführte Diskussion über den Zusammenhang zwischen NRF2-Aktivierung und MAFF. Einigkeit besteht darin, dass der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2/NFE2L2) eine zentrale Kontrollinstanz bei der akuten antioxidativen Stressantwort darstellt. Er wird durch ROS aktiviert und induziert nach einer Dimerisierung mit MAFF u. a. die Expression von Genen, die für antioxidativ und radikalneutralisierend wirkende Faktoren kodieren (Übersicht bei Blank, 2008).

Verschiedene Studien weisen zudem darauf hin, dass die Expression der *small MAF*-Gene NF- κ B-abhängig gesteuert wird. Auf diesem Wege hemmt p65 indirekt den NRF2-ARE-Signalweg, welcher in Entzündungsprozesse und Krebs involviert ist (Übersicht bei Kannan *et al.*, 2012). Auch im Rahmen der hier vorliegenden Studie konnte nach PDTC-Behandlung keine durch das Laufen induzierte verstärkte *Maff*-Expression mehr beobachtet werden, was dafür spricht, dass NF- κ B auch für die trainingsvermittelte Induktion der *Maff*-Genexpression wichtig sein könnte.

Da MAFF als Marker der antioxidativen Stressantwort gilt und die Expression des für diesen Marker kodierenden Gens bei den PDTC-behandelten Tieren nach Laufbelastung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen deutlich geringer war, ist es naheliegend zu vermuten, dass dies auf geringeren oxidativen Stress bei diesen Tieren hindeutet. Dies ist auch deswegen wahrscheinlich, weil PDTC selbst ein Antioxidans darstellt (Feng *et al.*, 2013; Mariappan *et al.*, 2010). Es ist aber auch möglich, dass unter einer PDTC-Behandlung die antioxidative Stressantwort möglicherweise nicht mehr vollständig funktioniert, z. B., weil diese z.T. über NF- κ B oder andere von PDTC beeinflusste Signalwege erfolgt.

5.2.4.4 Sowohl eine Laufbelastung als auch eine PDTC-Behandlung wirken sich auf Gene, die für Regulatoren des Skelettmuskelmetabolismus kodieren, aus

5.2.4.4.1 Die *Ppp1r3a*-Expression wird durch körperliches Training reprimiert; dies wird durch eine PDTC-Behandlung verstärkt

Ppp1r3a kodiert für eine Untereinheit der Proteinphosphatase1 (PP1). Das Gen wird hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert. Die PP1 ist in die Regulation des Glykogenmetabolismus und anderer Stoffwechselwege involviert (Manabe *et al.*, 2013; Übersicht bei Newgard *et al.*, 2000). PPP1R3A unterscheidet sich zudem von den anderen PP1-Untereinheiten durch eine hydrophobe Domäne, welche die Bindung an das sarkoplasmatische Retikulum ermöglicht. Des Weiteren enthält das Protein zwei Serinreste

(Ser46 und Ser67). Die Phosphorylierung von Ser67 durch die Proteinkinase A verhindert dabei die Bindung des PPP1R3A an PP1 (Liu und Brautigan, 2000; Übersicht bei Newgard *et al.*, 2000). Löst sich PPP1R3A von der PP1, führt dies zu einer Dephosphorylierung und damit der Aktivierung der Glykogensynthase sowie der Inaktivierung der Glykogenphosphorylase und der Phosphorylasekinase und fördert damit die Glykogensynthese. Da Glykogen einen wichtigen Kohlenhydratspeicher im Skelettmuskel darstellt, spielt PPP1R3A eine wichtige Rolle bei den Skelettmuskelanpassungen in Antwort auf einen Trainingsreiz (Aschenbach *et al.*, 2001; Manabe *et al.*, 2013). Zudem wird in der Literatur immer wieder über die Rolle von Polymorphismen innerhalb des *Ppp1r3a*-Gens bei der Entstehung einer Insulinresistenz bzw. bei der Erkrankung an einem Typ-II-Diabetes diskutiert (Hansen *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 1998).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiesen die „Nichtläufer“ tendenziell eine höhere *Ppp1r3*-Expression im Vergleich zu den Tieren, die eine Trainingseinheit absolviert hatten, auf. In der Studie von Manabe *et al.* (2013) konnte zwar für die *Ppp1*-Expression ein Anstieg nach vier und sieben Wochen Training gemessen werden, die Expression des für ihre regulatorische, skelettmuskelspezifische Untereinheit PPP1R3A kodierenden Gens war jedoch, wie in der zugrundeliegenden Studie dieser Arbeit, ebenfalls verringert. Die Reduktion der *Ppp1r3a*-Expression könnte somit eine adaptive Antwort auf einen Trainingsreiz darstellen. Der Skelettmuskel wäre dadurch eventuell besser dazu in der Lage, bei körperlicher Arbeit den Glykogenhaushalt aufrecht zu erhalten bzw. Glykogen zu akkumulieren.

Interessanterweise weist das Transkript des *Ppp1r3a*-Gens Bindungsstellen für *ARE-binding proteins* auf, zu denen auch ZFP36 gehört (Lannér *et al.*, 2001), sodass die Möglichkeit besteht, dass es durch ZFP36 destabilisiert wird. Dies würde zu den Ergebnissen dieser Arbeit passen: Die Expression von *Ppp1r3a* war bei den PDTC-behandelten, trainierten Tieren, in denen ja wie oben beschrieben eine verminderte *Zfp36*-Expression nachgewiesen worden war, gegenüber den unbehandelten „Läufern“ tatsächlich erhöht. Wenngleich nicht entschieden werden kann, ob ein kausaler Zusammenhang vorliegt, stellt dieser Befund einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Analysen dar.

5.2.4.4.2 Die *Nr4a3*-Expression bleibt nach einem Trainingsreiz unverändert, eine PDTC-Behandlung verringert tendenziell die *Nr4a3*-Expression

Die NR4A-Familie, davon insbesondere die Mitglieder NR4A1 und NR4A3, spielt eine große Rolle im Energiemetabolismus und in der akuten Anpassungsreaktion in Antwort auf einen Trainingsreiz (Catoire *et al.*, 2012). Die *Nr4a*-Gene sind im Skelettmuskel, aber auch in zahlreichen anderen metabolisch aktiven Geweben wie z. B. Herz, Leber, Fettgewebe, Niere oder dem Gehirn exprimiert (Übersicht bei Zhao und Bruemmer, 2010). Daraus resultiert eine verbesserte Ausdauerkapazität sowie eine erhöhte Ermüdungs- und Kälteresistenz (Pearen *et al.*, 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine trainingsbedingte Veränderung der *Nr4a3*-Expression festgestellt werden. Dies überrascht, da in verschiedenen Studien, sowohl im Tiermodell (Ratte, Schwein) als auch in humanen Studien ein deutlicher und unmittelbarer Anstieg verschiedener *Nr4a*-Gene nach Belastung beschrieben wurde (Catoire *et al.*, 2012; Steinacker *et al.*, 2002). Diese erfolgt über eine belastungsinduzierte Ausschüttung von Katecholaminen und einer daraus resultierenden β 2-adrenergen Stimulation (Catoire *et al.*, 2012; Steinacker *et al.*, 2002). Catoire *et al.* (2012) beschreiben zudem, dass *Nr4a3* während des Trainings nur geringfügig induziert wird, die Expression dieses Gens jedoch nach ungefähr drei Stunden sein Maximum erreicht, um anschließend wieder stark abzufallen. Möglicherweise war der Zeitpunkt der Muskelentnahme in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie ungünstig, ggf. zu spät gewählt, wodurch ein möglicher Anstieg der *Nr4a3*-Expression nach der Trainingseinheit nicht nachweisbar war. Da, wie zuvor bei den „chronischen“ Mäusen beschrieben, die oxidative Enzymaktivität des *M. tibialis anterior* von der Oberfläche des Muskels zur Tiefe hin zunimmt (Ishihara *et al.*, 2002), kann es auch möglich sein, dass Muskelregionen untersucht wurden, bei denen nur geringe Anpassungen in Bezug auf den Marker NR4A4 zu erwarten waren. Es ist weiterhin bekannt, dass eine vermehrte Expression von *Nr4a3* zu einem verstärkt oxidativen Metabolismus führt. Dadurch wird im Skelettmuskel eine erhöhte Ermüdungsresistenz und eine verbesserte Ausdauerkapazität ermöglicht (Pearen *et al.*, 2012). Jedoch ist der *M. tibialis anterior*, wie zuvor beschrieben, aufgrund seiner überwiegend vorkommenden Typ-II-Fasern nur gering zur weiteren oxidativen Anpassung fähig (Augusto *et al.*, 2004; Pearen *et al.*, 2009). Auch dies könnte eine Erklärung für den fehlenden trainingsbedingten Effekt auf die *Nr4a3*-Expression sein.

Bei den „inaktiven“ Tieren war die *Nr4a3*-Expression nach PDTC-Behandlung tendenziell reprimiert. Insgesamt konnte sowohl bei den „Läufern“ als auch bei den „Nichtläufern“ ein tendenziell inhibitorischer Effekt des PDTCs auf die *Nr4a3*-Expression beobachtet werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen verschiedener anderer Studien, in wel-

chen für NF- κ B eine entscheidende Rolle als Regulator der *Nr4a1-3*-Genexpression in myeloiden Zellarten beschrieben wurde (Übersicht bei Murphy und Crean, 2015).

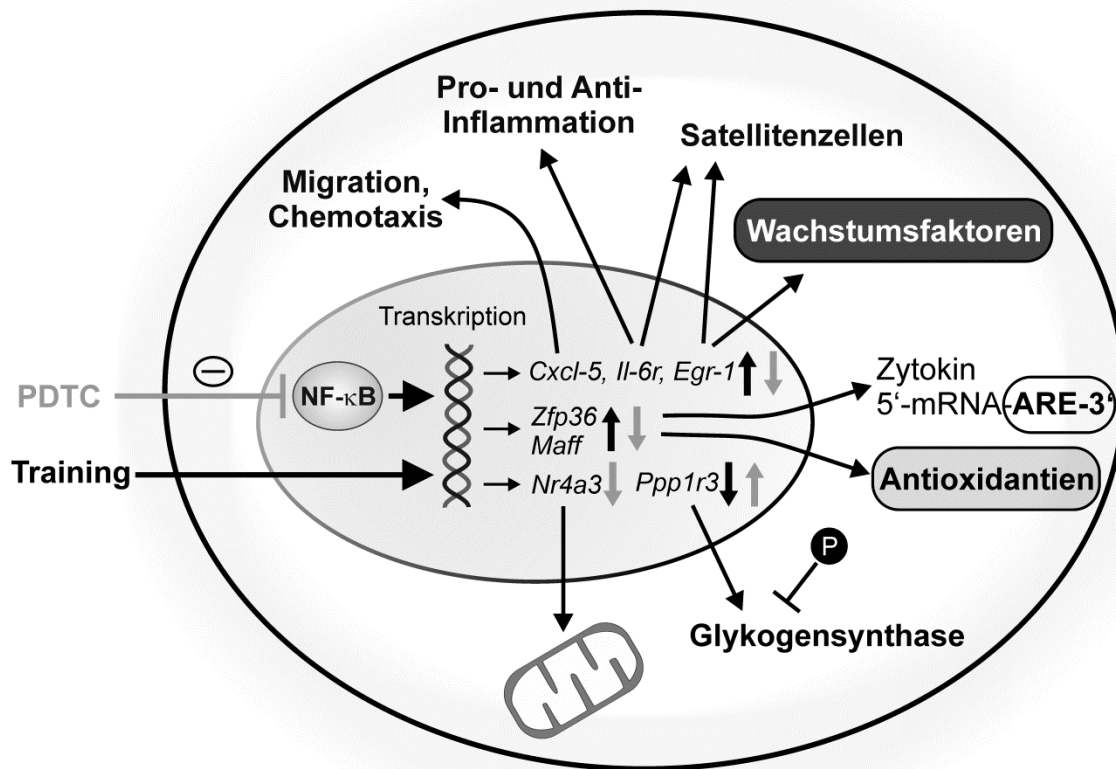


Abb. 29: Schematische Darstellung der Funktionen der trainingsbedingt (↑) und/oder durch PDTC (↑) regulierten Gene nach einer Akutbelastung des Skelettmuskels

Durch ein akutes körperliches Training bzw. eine einmalige PDTC-Applikation wird in Skelettmuskelzellen die Expression zahlreicher Gene verändert. So reguliert eine Laufbelastung die Expression von *Cxcl-5*, *Il-6r*, *Egr-1*, *Zfp-36* und *Maff* hoch und die von *Ppp1r3* tendenziell herunter. Eine PDTC-Behandlung hingegen reprimiert die Expression der für *CXCL-5*, *IL-6R*, *Egr-1*, *ZFP36*, *MAFF* und *NR4A3* kodierenden Gene. Die Expression von *Ppp1r3a* ist unter einer PDTC-Medikation dagegen tendenziell erhöht. In die Trainingsanpassung des Skelettmuskels sind dabei verschiedenste zelluläre Funktionsbereiche (Pro- und Anti-Inflammation, Metabolismus) involviert.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Insgesamt lässt sich sagen, dass bei dem durchgeführten „chronischen“ Training insbesondere das für die E3-Ubiquitin-Ligase *Atrogin-1* kodierende Gen durch den Trainingsreiz im *M. tibialis anterior* reprimiert wurde, ein Effekt, der nach PDTC-Behandlung nicht mehr nachweisbar war. Dies unterstützt zumindest für den *M. tibialis anterior* die These, dass körperliches Training katabolen Prozessen im Skelettmuskel, z. B. einer Kachexie, entgegenwirken könnte. Die Tatsache, dass bei den „chronischen“ Tieren aufgrund der gesteigerten I κ B- α -Konzentration eine produktive Hemmung des NF- κ B-Signalwegs durch PDTC wahrscheinlich scheint, spricht zudem dafür, dass aktives NF- κ B für diesen anti-kachektischen Trainingseffekt notwendig sein könnte. In Antwort auf eine „akute“ Trainingseinheit reagierten insbesondere die für den Rezeptor des proinflammatorischen Zytokins IL-6, das antiinflammatorische ZFP36, das in die oxidative Stressantwort involvierte MAFF sowie PPP1R3A, welches den Glykogenmetabolismus im Skelettmuskel reguliert, kodierenden Gene im *M. tibialis anterior* signifikant. Der scheinbare Widerspruch zwischen gleichzeitiger Induktion von für pro- und antiinflammatorische Produkte kodierenden Genen ist tatsächlich ein Grundprinzip vieler akuter Signalwege. Der Organismus ist dadurch in der Lage, schnell zu reagieren, sobald eine proinflammatorische Situation beendet werden soll. Somit liegt es nahe, dass diese vermeintlichen Gegenspieler oftmals über dieselben Signalwege induziert werden. Da bei den „akuten“ Tieren anhand der I κ B- α -Konzentration zumindest zum Untersuchungszeitpunkt im *M. tibialis anterior* keine NF- κ B-Inhibition nachgewiesen werden konnte, die Expressionsmuster der erwähnten Gene jedoch durch PDTC beeinflusst wurden, rücken neben der Hemmung des NF- κ B-Signalwegs weitere Wirkmechanismen des applizierten PDTCs in den Fokus. Hier ist insbesondere die Wirkung des PDTCs als Antioxidans und seine daraus resultierende Beeinflussung verschiedener ROS-*getriggert*er Signalwege zu nennen. Da im Rahmen dieser Arbeit nur ausgewählte Gene untersucht wurden, die stellvertretend für unterschiedliche zelluläre Funktionsbereiche stehen, welche im Zusammenhang mit einer Trainingsanpassung des Skelettmuskels relevant sind (Metabolismus, Pro-/Anti-Inflammation, Sarkomerumbau), wäre es interessant, die Ergebnisse in weiterführenden „Omics“-Analysen, beispielsweise mittels cDNA-Arrays oder proteomischer Methoden, zu untermauern. Zudem wäre es aufschlussreich, die Frage zu klären, ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit zum *M. tibialis anterior* auch an anderen Muskeltypen reproduzieren lassen. Hieraus könnten sich dann, wie weiter oben schon angedeutet, interessante therapeutische Ansatzpunkte ergeben, beispielsweise hinsichtlich der Frage, wie sich eine antiinflammatorisch wirkende Komedikation auf die Erfolge einer Trainingstherapie auswirkt.

6. Zusammenfassung

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Trainingsanpassung des Skelettmuskels

Der Einfluss von körperlichem Training auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) im Skelettmuskel wurde bisher nur wenig untersucht. Verschiedene Autoren konnten bei einer einmaligen „Akutbelastung“ eine NF- κ B-Aktivierung beobachten. Die Effekte von regelmäßigem, „chronischem“ Training werden jedoch kontrovers diskutiert: Einige Studien konnten eine erhöhte NF- κ B-Aktivität nach „chronischem“ Training nachweisen, in anderen ergab sich dagegen eine reduzierte Aktivität dieses Transkriptionsfaktors im Skelettmuskelgewebe. Die Frage, ob die NF- κ B-Aktivität durch Training beeinflusst wird, ist insbesondere aufgrund der Tatsache interessant, dass für den NF- κ B-aktivierenden Faktor *tumor necrosis factor-receptor associated factor* (TRAF6) eine Beteiligung an kachektischen Prozessen, also Skelettmuskeltatabolismus im Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen, nachgewiesen ist: Fehlt TRAF6, so sind kachektische Prozesse deutlich verlangsamt, was wiederum auf einer verminderten NF- κ B-Aktivität im Skelettmuskel beruhen könnte.

Da körperliches Training ebenfalls einen kachexiepräventiven Effekt hat, ergab sich für diese Arbeit zunächst die Frage, welchen Einfluss Training auf die NF- κ B-Aktivität und die TRAF6-Konzentration im Skelettmuskel hat. Hierfür wurde ein Laufbandtrainingsmodell etabliert. Dabei wurden Mäuse der Linie C57BL/6J sowohl einem zehnwöchigen „chronischen“ als auch einem einmaligen „akuten“ Laufbandtraining unterzogen. Im Vergleich zu entsprechenden „inaktiven“ Kontrolltieren ergaben sich bei beiden Versuchsansätzen keine Unterschiede bezüglich der NF- κ B-Aktivität oder der TRAF6-Konzentration im Skelettmuskel *M. tibialis anterior*, was dagegen spricht, dass ein Lauftraining diese Faktoren unmittelbar beeinflusst. Möglich wäre jedoch, dass entsprechende Veränderungen aufgrund des Versuchsdesigns nicht erfasst wurden. Um daher zu analysieren, ob eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität die Trainingsanpassung des Skelettmuskels beeinflusst, wurde ein Teil der Tiere zusätzlich mit dem NF- κ B-Inhibitor Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) behandelt, wobei eine erfolgreiche Hemmung zumindest bei den Mäusen, die über zehn Wochen behandelt worden waren, eindeutig nachweisbar war. Zudem ergab sich bei diesen Tieren, dass zumindest auf mRNA-Ebene das für die E3-Ubiquitin-Ligase Atrogin-1 kodierende Gen durch den Trainingsreiz reprimiert wurde. Nach PDTC-Behandlung war die *Atrogin-1*-Expression dagegen schon in untrainierten Tieren vergleichbar niedrig und wurde durch ein Training nicht weiter reprimiert. Da Atrogin-1 einen wichtigen Faktor beim Abbau von Sarkomerproteinen darstellt und bei

kachektischen Prozessen in erhöhter Konzentration vorliegt, unterstützt dieser Befund die These, dass körperliches Training katabolen Prozessen im Skelettmuskel, z. B. einer Kachexie, entgegenwirken könnte. Jedoch blieb die Expression einiger weiterer Gene, deren Produkte neben Atrogin-1 mit Sarkomerauf-, -ab- und -umbau assoziiert sind, wie *α-actinin 3 (Actn3)*, *muscle ring-finger protein-1 (Murf1)*, *skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex alpha (skNac)* und *set and mynd domain containing 1 (Smyd1)*, nach mehrwöchigem Training und/oder dauerhafter PDTC-Behandlung unbeeinflusst. Überraschenderweise zeigte auch das mit Ausdauertraining assoziierte *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (Pgc-1α)*-Gen, welches für einen Regulator der Mitochondrienfunktion kodiert, keine Regulation. Diese Daten sprechen dafür, dass sowohl ein regelmäßiges Lauftraining als auch eine länger andauernde PDTC-Behandlung das Genexpressionsmuster im murinen Skelettmuskel dauerhaft überraschend wenig und vermutlich eher sehr spezifisch modulieren.

In Antwort auf eine „akute“ Laufbelastung war dagegen die Expression anderer Gene reguliert. Insbesondere das *Il-6r*-Gen, welches für den Rezeptor des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) kodiert, war nach einer einmaligen Laufeinheit signifikant induziert. Diese Induktion wurde durch PDTC reprimiert. Ein ähnlicher Effekt konnte in Bezug auf die Expression des *v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog f (Maff)*-Gens, das in die oxidative Stressantwort involviert ist, beobachtet werden. Das *zinc finger protein 36 (Zfp36)*-Gen, welches für das antiinflammatorisch wirkende ZFP36-Protein kodiert, wurde dagegen durch eine Kombination aus Laufen und PDTC-Behandlung reprimiert. Schließlich konnte für das *protein phosphatase 1 regulatory subunit 3 a (Ppp1r3a)*-Gen, welches für einen Regulator des Glykogenmetabolismus im Skelettmuskel kodiert, nach einer PDTC-Medikation sowohl bei den „Läufern“ als auch bei den „Nichtläufern“ gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppe eine Induktion beobachtet werden. Da jedoch bei den „akut“ belasteten Tieren die NF-κB-hemmende Wirkung des PDTCs nicht direkt nachgewiesen werden konnte, sind für diese Effekte ggf. andere PDTC-Wirkungen verantwortlich, insbesondere eine Beeinflussung der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit eine Beeinflussung ROS-vermittelter Signalwege.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sehr spezifische Gene aus unterschiedlichen zellulären Funktionsbereichen (Pro-/Anti-Inflammation, Sarkomerumbau, Metabolismus) im Rahmen einer Trainingsanpassung des Skelettmuskels (speziell des *M. tibialis anterior*) reguliert werden und dass die entsprechenden Genexpressionsmuster auf komplexe Art und Weise durch eine PDTC-Applikation beeinflusst werden. Aus den Resultaten dieser Arbeit könnten sich interessante therapeutische Ansatzpunkte ergeben, z. B. hinsichtlich der Frage, wie sich eine antiinflammatorisch wirkende Komedikation auf die Erfolge einer Trainingstherapie auswirkt.

7. Summary

The role of the transcription factor NF- κ B in skeletal muscle in response to exercise

Regulation and function of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in skeletal muscle responses to exercise is poorly understood. Few previous studies demonstrated that an acute bout of exercise activates this transcription factor. Nevertheless, the role of NF- κ B signaling in long-term functional adaptations of skeletal muscle is still a matter of controversy: Whereas some studies could demonstrate increased activity of NF- κ B in response to regular endurance exercise, others showed reduced NF- κ B activity levels in the trained skeletal muscle. It is well recognized that NF- κ B signaling plays a crucial role in pathophysiological conditions of muscle wasting commonly associated with chronic inflammation. Furthermore, recent studies identified tumor necrosis factor-receptor associated factor (TRAF6) as an important signal transducer involved in the activation of NF- κ B during skeletal muscle atrophy, and its inhibition has been shown to prevent skeletal muscle wasting induced by cachexia in experimental models. Regular physical exercise is a proven strategy to prevent cachectic processes in skeletal muscle. Therefore, the primary aim of this thesis was to determine the influence of acute and long-term physical exercise on skeletal muscle NF- κ B activity and TRAF6 levels.

For this purpose, we established a treadmill-based experimental mouse exercise protocol. C57BL/6 mice completed either an acute bout of treadmill running or ten weeks of regular, standardized exercise training. When compared to sedentary control animals, no major effects of acute and long-term exercise on NF- κ B activity or TRAF6 levels were detectable in skeletal muscle tissue. However, it is well possible that potential effects might not have been captured by the study design.

To analyze a putative involvement of NF- κ B signaling in skeletal muscle adaptation to exercise - or to prove a lack thereof, NF- κ B activation was blocked in sedentary as well as exercising animals by application of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTTC). Chronic PDTTC treatment over a period of ten weeks indeed resulted in significant inhibition of NF- κ B activation pathways both in exercising and in control animals. Moreover, gene expression of a key regulator of atrophy, *atrogen-1*, was significantly reduced by exercise training. After PDTTC-induced blocking of NF- κ B signaling, *atrogen-1* expression was already low in sedentary animals and did not further decrease with training. These data suggest that inhibition of *atrogen-1* expression might be one mechanism by which regular exercise might contribute to the prevention and therapy of muscle-wasting conditions.

However, expression of genes encoding other sarcomere-associated factors, such as muscle ring-finger protein-1 (MURF-1), α -actinin 3 (ACTN3), skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex alpha (skNAC) or set and mynd domain containing 1 (SMYD1) was not altered by exercise or PDTC treatment.

In addition, expression of the gene encoding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α), a metabolic marker of endurance training, and of other metabolic and mitochondrial markers was not altered by exercise and/or PDTC treatment.

In response to an acute bout of exercise, we observed differential expression of a broad variety of genes, encoding mediators of acute inflammatory, oxidative and metabolic stress reactions. Most of them were modulated by parallel PDTC treatment in a complex manner. Specifically, the genes encoding Interleukin 6 receptor (IL-6R) and v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog f (MAFF) were induced by exercise. These effects were almost completely abolished by parallel PDTC application. Acute exercise in combination with PDTC treatment dampened expression of the gene encoding the anti-inflammatory zinc finger protein 36 (ZFP36). By contrast, expression of the gene encoding the protein phosphatase 1 regulatory subunit 3 a (PPP1R3A) increased after PDTC-application in exercised as well as in sedentary mice when compared to the respective control groups.

In contrast to long-term treatment, a single injection of PDTC did not affect I κ B- α -protein levels, suggesting that there was no robust NF- κ B inhibition. Thus, other effects of PDTC are likely to be responsible for the abovementioned effects on gene expression. Specifically, due to the free-radical scavenging properties of PDTC, it is conceivable that PDTC might have influenced the concentration of reactive oxygen species (ROS) and thus ROS signaling pathways in these animals.

Taken together, we could demonstrate specific gene-regulatory effects of both acute and chronic exercise in murine skeletal muscle tissue (specifically the *M. tibialis anterior*), which were modulated by PDTC treatment. Interestingly, we found effects on regulators of a broad variety of cellular processes, such as inflammation/anti-inflammation, metabolism, or sarcomerogenesis.

Our findings might have interesting therapeutic implications, specifically with respect to potential interactions of anti-inflammatory medication and exercise-based therapeutic regimens, for example in the context of muscle wasting conditions.

8. Literaturverzeichnis

1. Al-Nassan,S., Fujita,N., Kondo,H., Murakami,S., Fujino,H., 2012. Chronic Exercise Training Down-Regulates TNF-alpha and Atrogin-1/MAFbx in Mouse Gastrocnemius Muscle Atrophy Induced by Hindlimb Unloading. *Acta Histochem. Cytochem.* 45, 343-349.
2. Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Walter,P., 2007 *Molecular Biology of THE CELL*, 5 Edition. Garland Science, p. 1027.
3. Allen,D.L., Harrison,B.C., Maass,A., Bell,M.L., Byrnes,W.C., Leinwand,L.A., 2001. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J. Appl. Physiol* (1985) 90, 1900-1908.
4. Andersen,J.L., Klitgaard,H., Saltin,B., 1994. Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiol Scand.* 151, 135-142.
5. Antonescu,C.N., Foti,M., Sauvonnet,N., Klip,A., 2009. Ready, set, internalize: mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis. *Biosci. Rep.* 29, 1-11.
6. Arch,R.H., Gedrich,R.W., Thompson,C.B., 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* 12, 2821-2830.
7. Argiles,J.M., Busquets,S., Felipe,A., Lopez-Soriano,F.J., 2005. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1084-1104.
8. Ariano,M.A., Armstrong,R.B., Edgerton,V.R., 1973. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 51-55.
9. Aschenbach,W.G., Suzuki,Y., Breeden,K., Prats,C., Hirshman,M.F., Dufresne,S.D., Sakamoto,K., Vilaro,P.G., Steele,M., Kim,J.H., Jing,S.L., Goodyear,L.J., Paoli-Roach,A.A., 2001. The muscle-specific protein phosphatase PP1G/R(GL)(G(M))is essential for activation of glycogen synthase by exercise. *J. Biol. Chem.* 276, 39959-39967.
10. Augusto,V., Padovani,C.P., Campos,G.E.R., 2004. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz. J. morphol. Sci.* 21, 89-94.
11. Axiak,S., Johnson,P.J., 2012. Paraneoplastic manifestations of cancer in horses. *Equine vet. Educ.* 24, 367-376.
12. Bachmanov,A.A., Reed,D.R., Beauchamp,G.K., Tordoff,M.G., 2002. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav. Genet.* 32, 435-443.
13. Bauer,J.M., Wirth,R., Volkert,D., Werner,H., Sieber,C.C., 2008. Malnutrition, sarcopenia and cachexia in the elderly: from pathophysiology to treatment. Conclusions of an international meeting of experts, sponsored by the BANSS Foundation. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 133, 305-310.
14. Beiter,T., Hoene,M., Prenzler,F., Mooren,F.C., Steinacker,J.M., Weigert,C., Niess,A.M., Munz,B., 2015. Exercise, skeletal muscle and inflammation: ARE-binding proteins as key regulators in inflammatory and adaptive networks. *Exerc. Immunol. Rev.* 21, 42-57.

15. Bensellam,M., Montgomery,M.K., Luzuriaga,J., Chan,J.Y., Laybutt,D.R., 2015. Inhibitor of differentiation proteins protect against oxidative stress by regulating the antioxidant-mitochondrial response in mouse beta cells. *Diabetologia* 58, 758-770.
16. Berger,F., Berkholz,J., Breustedt,T., Ploen,D., Munz,B., 2012. Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 150-155.
17. Blank,V., 2008. Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J. Mol. Biol.* 376, 913-925.
18. Bodine,S.C., Baehr,L.M., 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 307, E469-E484.
19. Bradley,J.R., Poher,J.S., 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482-6491.
20. Brooks,S.V., Vasilaki,A., Larkin,L.M., McArdle,A., Jackson,M.J., 2008. Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation. *J. Physiol* 586, 3979-3990.
21. Brummer,H., Zhang,M.Y., Piddoubny,M., Medler,S., 2013. Hybrid fibers transform into distinct fiber types in maturing mouse muscles. *Cells Tissues. Organs* 198, 227-236.
22. Cai,D., Frantz,J.D., Tawa,N.E., Jr., Melendez,P.A., Oh,B.C., Lidov,H.G., Hasselgren,P.O., Frontera,W.R., Lee,J., Glass,D.J., Shoelson,S.E., 2004. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119, 285-298.
23. Capomaccio,S., Cappelli,K., Spinsanti,G., Mencarelli,M., Muscettola,M., Felicetti,M., Verini,S.A., Bonifazi,M., 2011. Athletic humans and horses: comparative analysis of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) expression in peripheral blood mononuclear cells in trained and untrained subjects at rest. *BMC. Physiol* 11, 3.
24. Carlson,C.G., Samadi,A., Siegel,A., 2005. Chronic treatment with agents that stabilize cytosolic IkkappaB-alpha enhances survival and improves resting membrane potential in MDX muscle fibers subjected to chronic passive stretch. *Neurobiol. Dis.* 20, 719-730.
25. Carson,J.A., Baltgalvis,K.A., 2010. Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 38, 168-176.
26. Castellani,L., Perry,C.G., Macpherson,R.E., Root-McCaig,J., Huber,J.S., Arkell,A.M., Simpson,J.A., Wright,D.C., 2015. Exercise-mediated IL-6 signaling occurs independent of inflammation and is amplified by training in mouse adipose tissue. *J. Appl. Physiol* (1985) 119, 1347-1354.
27. Catoire,M., Mensink,M., Boekschoten,M.V., Hangelbroek,R., Muller,M., Schrauwen,P., Kersten,S., 2012. Pronounced effects of acute endurance exercise on gene expression in resting and exercising human skeletal muscle. *PLoS. One.* 7, e51066.
28. Centner,T., Yano,J., Kimura,E., McElhinny,A.S., Pelin,K., Witt,C.C., Bang,M.L., Trombitas,K., Granzier,H., Gregorio,C.C., Sorimachi,H., Labeit,S., 2001. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J. Mol. Biol.* 306, 717-726.
29. Chabicovsky,M., Prieschl-Grassauer,E., Seipelt,J., Muster,T., Szolar,O.H., Hebar,A., Doblhoff-Dier,O., 2010. Pre-clinical safety evaluation of pyrrolidine dithiocarbamate. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107, 758-767.
30. Chapman,N.R., Perkins,N.D., 2000. Inhibition of the RelA(p65) NF-kappaB subunit by Egr-1. *J. Biol. Chem.* 275, 4719-4725.

31. Charles, J.P., Cappellari, O., Spence, A.J., Hutchinson, J.R., Wells, D.J., 2016. Musculoskeletal geometry, muscle architecture and functional specialisations of the mouse hindlimb. *PLoS One*. 11, e0147669.
32. Chen, X., Tang, Y., Gao, M., Qin, S., Zhou, J., Li, X., 2015. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in myocardial fibrosis in rat offspring. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 10986-10996.
33. Chen, Y.L., Jiang, Y.W., Su, Y.L., Lee, S.C., Chang, M.S., Chang, C.J., 2013. Transcriptional regulation of tristetraprolin by NF-kappaB signaling in LPS-stimulated macrophages. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2867-2877.
34. Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., Gregorio, C.C., 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 637-706.
35. Coffey, V.G., Shield, A., Canny, B.J., Carey, K.A., Cameron-Smith, D., Hawley, J.A., 2006. Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 290, E849-E855.
36. Coll, T., varez-Guardia, D., Barroso, E., Gomez-Foix, A.M., Palomer, X., Laguna, J.C., Vazquez-Carrera, M., 2010. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- κ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 151, 1560-1569.
37. Conejo, R., de, A.C., Benito, M., Cuadrado, A., Lorenzo, M., 2002. Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by inducing NF-kappaB through an AKT/P70S6K/p38-MAPK pathway. *Oncogene* 21, 3739-3753.
38. Craig, A., Mai, J., Cai, S., Jeyaseelan, S., 2009. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 77, 568-575.
39. Cuzzocrea, S., Chatterjee, P.K., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Britti, D., Mazzullo, G., Caputi, A.P., Thiemeermann, C., 2002. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 135, 496-510.
40. De Bono, J.P., Adlam, D., Paterson, D.J., Channon, K.M., 2006. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R926-R934.
41. Du, S.J., Li, H., Bian, Y., Zhong, Y., 2008. Heat-shock protein 90 α 1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 554-559.
42. Du, S.J., Tan, X., Zhang, J., 2014. SMYD proteins: key regulators in skeletal and cardiac muscle development and function. *Anat. Rec. (Hoboken)* 297, 1650-1662.
43. Egan, B., Zierath, J.R., 2013. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 17, 162-184.
44. Feng, H., Kang, C., Dickman, J.R., Koenig, R., Awoyinka, I., Zhang, Y., Ji, L.L., 2013. Training-induced mitochondrial adaptation: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , nuclear factor-kappaB and beta-blockade. *Exp. Physiol* 98, 784-795.
45. Foletta, V.C., White, L.J., Larsen, A.E., Leger, B., Russell, A.P., 2011. The role and regulation of MAFbx/atrogenin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* 461, 325-335.
46. Freeman, L.M., 2012. Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 3-17.
47. Gashler, A., Sukhatme, V.P., 1995. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50, 191-224.

48. Gazda,L., Pokrzywa,W., Hellerschmied,D., Lowe,T., Forne,I., Mueller-Planitz,F., Hoppe,T., Clausen,T., 2013. The myosin chaperone UNC-45 is organized in tandem modules to support myofilament formation in *C. elegans*. *Cell* 152, 183-195.
49. GeneCards. <http://www.genecards.org/>. (Last accessed December 15, 2016).
50. Ghosh,G., Wang,V.Y., Huang,D.B., Fusco,A., 2012. NF-kappaB regulation: lessons from structures. *Immunol. Rev.* 246, 36-58.
51. Ghosh,S., Hayden,M.S., 2012. Celebrating 25 years of NF-kappaB research. *Immunol. Rev.* 246, 5-13.
52. Goh,J., Ladiges,W., 2015. Voluntary wheel running in mice. *Curr. Protoc. Mouse. Biol.* 5, 283-290.
53. Gomes,M.D., Lecker,S.H., Jagoe,R.T., Navon,A., Goldberg,A.L., 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14440-14445.
54. Gu,H., Cao,Y., Qiu,B., Zhou,Z., Deng,R., Chen,Z., Li,R., Li,X., Wei,Q., Xia,X., Yong,W., 2016. Establishment and phenotypic analysis of an Mstn knockout rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 115-122.
55. Gu,J.W., Young,E., Busby,B., Covington,J., Johnson,J.W., 2009. Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. *Cancer Biol. Ther.* 8, 514-521.
56. Gupta,S.C., Kim,J.H., Kannappan,R., Reuter,S., Dougherty,P.M., Aggarwal,B.B., 2011. Role of nuclear factor kappaB-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 236, 658-671.
57. Guttridge,D.C., Mayo,M.W., Madrid,L.V., Wang,C.Y., Baldwin,A.S., Jr., 2000. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 289, 2363-2366.
58. Hai,T., Wolford,C.C., Chang,Y.S., 2010. ATF3, a hub of the cellular adaptive-response network, in the pathogenesis of diseases: is modulation of inflammation a unifying component? *Gene Expr.* 15, 1-11.
59. Hansen,L., Reneland,R., Berglund,L., Rasmussen,S.K., Hansen,T., Lithell,H., Pedersen,O., 2000. Polymorphism in the glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase (PPP1R3) gene and insulin sensitivity. *Diabetes* 49, 298-301.
60. Harridge,S.D., 2007. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp. Physiol* 92, 783-797.
61. Hartl,F.U., Hayer-Hartl,M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
62. Hayakawa,M., Miyashita,H., Sakamoto,I., Kitagawa,M., Tanaka,H., Yasuda,H., Karin,M., Kikugawa,K., 2003. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J.* 22, 3356-3366.
63. Higuchi,R., Dollinger,G., Walsh,P.S., Griffith,R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* 10, 413-417.
64. Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., Watson,R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 11, 1026-1030.

65. Hoesel,B., Schmid,J.A., 2013. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86.
66. Hofman,W., 2005. Rinderkrankheiten- Innere und chirurgische Erkrankungen. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, Stuttgart, pp. 200-206, 325-383.
67. Hoppeler,H., Baum,O., Lurman,G., Mueller,M., 2011. Molecular mechanisms of muscle plasticity with exercise. *Compr. Physiol* 1, 1383-1412.
68. Hostager,B.S., Haxhinasto,S.A., Rowland,S.L., Bishop,G.A., 2003. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 45382-45390.
69. Hwang,I., Gottlieb,P.D., 1997. The Bop gene adjacent to the mouse CD8b gene encodes distinct zinc-finger proteins expressed in CTLs and in muscle. *J. Immunol.* 158, 1165-1174.
70. Ishihara,A., Hirofujii,C., Nakatani,T., Itoh,K., Itoh,M., Katsuta,S., 2002. Effects of running exercise with increasing loads on tibialis anterior muscle fibres in mice. *Exp. Physiol* 87, 113-116.
71. Jackman,R.W., Cornwell,E.W., Wu,C.L., Kandarian,S.C., 2013. Nuclear factor-kappaB signaling and transcriptional regulation in skeletal muscle atrophy. *Exp. Physiol* 98, 19-24.
72. Ji,L.L., Gomez-Cabrera,M.C., Steinhafel,N., Vina,J., 2004. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J.* 18, 1499-1506.
73. Johnson,D.R., Pober,J.S., 1994. HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons. *Mol. Cell Biol.* 14, 1322-1332.
74. Kannan,M.B., Solovieva,V., Blank,V., 2012. The small MAF transcription factors MAFF, MAFK and MAFK: current knowledge and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1841-1846.
75. Keller,C., Steensberg,A., Hansen,A.K., Fischer,C.P., Plomgaard,P., Pedersen,B.K., 2005. Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* (1985) 99, 2075-2079.
76. Kho,A.T., Kang,P.B., Kohane,I.S., Kunkel,L.M., 2006. Transcriptome-scale similarities between mouse and human skeletal muscles with normal and myopathic phenotypes. *BMC. Musculoskelet. Disord.* 7, 23.
77. Kopple,J.D., Wang,H., Casaburi,R., Fournier,M., Lewis,M.I., Taylor,W., Storer,T.W., 2007. Exercise in maintenance hemodialysis patients induces transcriptional changes in genes favoring anabolic muscle. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2975-2986.
78. Korthuis,R.J., 2011 *Skeletal Muscle Circulation*. Morgan and Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
79. Kramer,H.F., Goodyear,L.J., 2007. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* (1985) 103, 388-395.
80. Kumar,A., Takada,Y., Boriek,A.M., Aggarwal,B.B., 2004. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J. Mol. Med. (Berl)* 82, 434-448.
81. Kumar,A., Bhatnagar,S., Paul,P.K., 2012. TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 15, 233-239.
82. Kwon,H.S., Harris,R.A., 2004. Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression. *Adv. Enzyme Regul.* 44, 109-121.

83. Kwon,J.W., Kwon,H.K., Shin,H.J., Choi,Y.M., Anwar,M.A., Choi,S., 2015. Activating transcription factor 3 represses inflammatory responses by binding to the p65 subunit of NF-kappaB. *Sci. Rep.* 5, 14470.
84. Laemmli,U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
85. Lambernd,S., Taube,A., Schober,A., Platzbecker,B., Gorgens,S.W., Schlich,R., Jeruschke,K., Weiss,J., Eckardt,K., Eckel,J., 2012. Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia* 55, 1128-1139.
86. Lanner,C., Suzuki,Y., Bi,C., Zhang,H., Cooper,L.D., Bowker-Kinley,M.M., Paoli-Roach,A.A., 2001. Gene structure and expression of the targeting subunit, RGL, of the muscle-specific glycogen-associated type 1 protein phosphatase, PP1G. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 135-145.
87. Lehtinen,S.K., Rahkila,P., Helenius,M., Korhonen,P., Salminen,A., 1996. Down-regulation of transcription factors AP-1, Sp-1, and NF-kappa B precedes myocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 36-43.
88. Lenk,K., Schuler,G., Adams,V., 2010. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J. Cachexia. Sarcopenia. Muscle* 1, 9-21.
89. Li,H., Randall,W.R., Du,S.J., 2009. skNAC (skeletal Naca), a muscle-specific isoform of Naca (nascent polypeptide-associated complex alpha), is required for myofibril organization. *FASEB J.* 23, 1988-2000.
90. Li,L., Pan,R., Li,R., Niemann,B., Aurich,A.C., Chen,Y., Rohrbach,S., 2011. Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. *Diabetes* 60, 157-167.
91. Li,Y.P., Schwartz,R.J., Waddell,I.D., Holloway,B.R., Reid,M.B., 1998. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J.* 12, 871-880.
92. Li,Y.P., Schwartz,R.J., 2001. TNF-alpha regulates early differentiation of C2C12 myoblasts in an autocrine fashion. *FASEB J.* 15, 1413-1415.
93. Liang,R., Swanson,J.M., Peng,Y., Wikstrom,M., Voth,G.A., 2016. Multiscale simulations reveal key features of the proton-pumping mechanism in cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 113, 7420-7425.
94. Liu,F., Xia,Y., Parker,A.S., Verma,I.M., 2012. IKK biology. *Immunol. Rev.* 246, 239-253.
95. Liu,J., Brautigan,D.L., 2000. Glycogen synthase association with the striated muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase-1. Synthase activation involves scaffolding regulated by beta-adrenergic signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 26074-26081.
96. Livak,K.J., Schmittgen,T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.
97. Lopez-Vinas,E., Bentebibel,A., Gurunathan,C., Morillas,M., de,A.D., Serra,D., Asins,G., Hegardt,F.G., Gomez-Puertas,P., 2007. Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A. *J. Biol. Chem.* 282, 18212-18224.
98. Ma,K., Mallidis,C., Artaza,J., Taylor,W., Gonzalez-Cadavid,N., Bhasin,S., 2001. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 281, E1128-E1136.

99. Malm,T.M., Iivonen,H., Goldsteins,G., Keksa-Goldsteine,V., Ahtoniemi,T., Kanninen,K., Salminen,A., Auriola,S., Van,G.T., Tanila,H., Koistinaho,J., 2007. Pyrrolidine dithiocarbamate activates Akt and improves spatial learning in APP/PS1 mice without affecting beta-amyloid burden. *J. Neurosci.* 27, 3712-3721.
100. Manabe,Y., Gollisch,K.S., Holton,L., Kim,Y.B., Brandauer,J., Fujii,N.L., Hirshman,M.F., Good-year,L.J., 2013. Exercise training-induced adaptations associated with increases in skeletal muscle glycogen content. *FEBS J.* 280, 916-926.
101. Mariappan,N., Elks,C.M., Sriramula,S., Guggilam,A., Liu,Z., Borkhsenius,O., Francis,J., 2010. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc. Res.* 85, 473-483.
102. McElhinny,A.S., Kakinuma,K., Sorimachi,H., Labeit,S., Gregorio,C.C., 2002. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J. Cell Biol.* 157, 125-136.
103. McFarlane,C., Plummer,E., Thomas,M., Hennebry,A., Ashby,M., Ling,N., Smith,H., Sharma,M., Kambadur,R., 2006. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J. Cell Physiol* 209, 501-514.
104. McKenzie,M.J., Goldfarb,A.H., 2007. Aerobic exercise bout effects on gene transcription in the rat soleus. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1515-1521.
105. McLean,C.S., Mielke,C., Cordova,J.M., Langlais,P.R., Bowen,B., Miranda,D., Coletta,D.K., Mandarino,L.J., 2015. Gene and microRNA expression responses to exercise; relationship with insulin sensitivity. *PLoS. One.* 10, e0127089.
106. McPherron,A.C., Lawler,A.M., Lee,S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
107. Meek,T.H., Lonquich,B.P., Hannon,R.M., Garland,T., Jr., 2009. Endurance capacity of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *J. Exp. Biol.* 212, 2908-2917.
108. Messina,S., Bitto,A., Aguenouz,M., Minutoli,L., Monici,M.C., Altavilla,D., Squadrito,F., Vita,G., 2006. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp. Neurol.* 198, 234-241.
109. Mihara,M., Hashizume,M., Yoshida,H., Suzuki,M., Shiina,M., 2012. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)* 122, 143-159.
110. Minegishi,Y., Haramizu,S., Misawa,K., Shimotoyodome,A., Hase,T., Murase,T., 2015. Deletion of nuclear factor-kappaB p50 upregulates fatty acid utilization and contributes to an anti-obesity and high-endurance phenotype in mice. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 309, E523-E533.
111. Mouisel,E., Relizani,K., Mille-Hamard,L., Denis,R., Hourde,C., Agbulut,O., Patel,K., Arandel,L., Morales-Gonzalez,S., Vignaud,A., Garcia,L., Ferry,A., Luquet,S., Billat,V., Ventura-Clapier,R., Schuelke,M., Amthor,H., 2014. Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 307, R444-R454.
112. Mourkioti,F., Rosenthal,N., 2008. NF-kappaB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *J Mol Med. (Berl)* 86, 747-759.
113. Moynagh,P.N., 2005. The NF-kappaB pathway. *J. Cell Sci.* 118, 4589-4592.

114. Mueck,T., Berger,F., Buechsler,I., Valchanova,R.S., Landuzzi,L., Lollini,P.L., Klingel,K., Munz,B., 2011. TRAF6 regulates proliferation and differentiation of skeletal myoblasts. *Differentiation* 81, 99-106.
115. Mueller,T.C., Bachmann,J., Prokopchuk,O., Friess,H., Martignoni,M.E., 2016. Molecular pathways leading to loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia--can findings from animal models be translated to humans? *BMC. Cancer* 16, 75.
116. Munz,B., Wiedmann,M., Lochmuller,H., Werner,S., 1999. Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J. Biol. Chem.* 274, 13305-13310.
117. Munz,B., Hildt,E., Springer,M.L., Blau,H.M., 2002. RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation. *Mol. Cell Biol.* 22, 5879-5886.
118. Murphy,E.P., Crean,D., 2015. Molecular Interactions between NR4A Orphan Nuclear Receptors and NF-kappaB Are Required for Appropriate Inflammatory Responses and Immune Cell Homeostasis. *Biomolecules.* 5, 1302-1318.
119. Nabben,M., Hoeks,J., 2008. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiol Behav.* 94, 259-269.
120. Nai,Y.J., Jiang,Z.W., Wang,Z.M., Li,N., Li,J.S., 2007. Prevention of cancer cachexia by pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in colon 26 tumor-bearing mice. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 31, 18-25.
121. Nedachi,T., Fujita,H., Kanzaki,M., 2008. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 295, E1191-E1204.
122. Nedachi,T., Hatakeyama,H., Kono,T., Sato,M., Kanzaki,M., 2009. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 297, E866-E878.
123. Neubauer,O., Sabapathy,S., Ashton,K.J., Desbrow,B., Peake,J.M., Lazarus,R., Wessner,B., Cameron-Smith,D., Wagner,K.H., Haseler,L.J., Bulmer,A.C., 2014. Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. *J. Appl. Physiol* (1985.) 116, 274-287.
124. Newgard,C.B., Brady,M.J., O'Doherty,R.M., Saltiel,A.R., 2000. Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes* 49, 1967-1977.
125. O'Shea,J.M., Perkins,N.D., 2008. Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 603-608.
126. Okabe,C., Borges,R.L., de,A., Fanelli,C., Barlette,G.P., Machado,F.G., Arias,S.C., Malheiros,D.M., Camara,N.O., Zatz,R., Fujihara,C.K., 2013. NF-kappaB activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 305, F155-F163.
127. Ordway,G.A., Garry,D.J., 2004. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol.* 207, 3441-3446.
128. Ostrowski,K., Hermann,C., Bangash,A., Schjerling,P., Nielsen,J.N., Pedersen,B.K., 1998. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J. Physiol* 513 (Pt 3), 889-894.
129. Otto,A., Collins-Hooper,H., Patel,K., 2009. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J. Anat.* 215, 477-497.

130. Papadimitriou,I.D., Lucia,A., Pitsiladis,Y.P., Pushkarev,V.P., Dyatlov,D.A., Orekhov,E.F., Artioli,G.G., Guilherme,J.P., Lancha,A.H., Jr., Gineviciene,V., Cieszczyk,P., Iejewska-Karłowska,A., Sawczuk,M., Muniesa,C.A., Kouvatzi,A., Massidda,M., Calo,C.M., Garton,F., Houweling,P.J., Wang,G., Austin,K., Druzhevskaya,A.M., Astratenkova,I.V., Ahmetov,I.I., Bishop,D.J., North,K.N., Eynon,N., 2016. ACTN3 R577X and ACE I/D gene variants influence performance in elite sprinters: a multi-cohort study. *BMC. Genomics* 17, 285.
131. Park,C.Y., Pierce,S.A., von,D.M., Ivey,K.N., Morgan,J.A., Blau,H.M., Srivastava,D., 2010. skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 20750-20755.
132. Parodi,F.E., Mao,D., Ennis,T.L., Bartoli,M.A., Thompson,R.W., 2005. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in mice by treatment with pyrrolidine dithiocarbamate, an antioxidant inhibitor of nuclear factor-kappaB. *J. Vasc. Surg.* 41, 479-489.
133. Paul,P.K., Gupta,S.K., Bhatnagar,S., Panguluri,S.K., Darnay,B.G., Choi,Y., Kumar,A., 2010. Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J. Cell Biol.* 191, 1395-1411.
134. Paul,P.K. 2011. TRAF6 signaling in skeletal muscle atrophy and regeneration. *Electronic Theses and Dissertations Paper* 1101. University of Louisville.
135. Paul,P.K., Bhatnagar,S., Mishra,V., Srivastava,S., Darnay,B.G., Choi,Y., Kumar,A., 2012. The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol. Cell Biol.* 32, 1248-1259.
136. Pearen,M.A., Ryall,J.G., Lynch,G.S., Muscat,G.E., 2009. Expression profiling of skeletal muscle following acute and chronic beta2-adrenergic stimulation: implications for hypertrophy, metabolism and circadian rhythm. *BMC. Genomics* 10, 448.
137. Pearen,M.A., Eriksson,N.A., Fitzsimmons,R.L., Goode,J.M., Martel,N., Andrikopoulos,S., Muscat,G.E., 2012. The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Mol. Endocrinol.* 26, 372-384.
138. Pedersen,B.K., Steensberg,A., Fischer,C., Keller,C., Ostrowski,K., Schjerling,P., 2001. Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. *Exerc. Immunol. Rev.* 7, 18-31.
139. Pette,D., Staron,R.S., 1997. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* 170, 143-223.
140. Pfaffl,M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 12, e45.
141. Pfaffl,M.W., Horgan,G.W., Dempfle,L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
142. Pillon,N.J., Bilan,P.J., Fink,L.N., Klip,A., 2013. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 304, E453-E465.
143. Rosa,E.F., Silva,A.C., Ihara,S.S., Mora,O.A., Aboulafia,J., Nouailhetas,V.L., 2005. Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging. *J. Appl. Physiol* (1985.) 99, 1569-1575.
144. Rutter,J., Winge,D.R., Schiffman,J.D., 2010. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion.* 10, 393-401.

145. Sacheck, J.M., Ohtsuka, A., McLary, S.C., Goldberg, A.L., 2004. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 287, E591-E601.
146. Saini, A., Al-Shanti, N., Stewart, C.E., 2006. Waste management - cytokines, growth factors and cachexia. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 475-486.
147. Schiaffino, S., Reggiani, C., 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 91, 1447-1531.
148. Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B., Sandri, M., 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280, 4294-4314.
149. Schmidt, J., Stoffels, B., Moore, B.A., Chanthaphavong, R.S., Mazie, A.R., Buchholz, B.M., Bauer, A.J., 2008. Proinflammatory role of leukocyte-derived Egr-1 in the development of murine postoperative ileus. *Gastroenterology* 135, 926-36, 936.
150. Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W., Baeuerle, P.A., 1992. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* 175, 1181-1194.
151. Sen, R., Baltimore, D., 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
152. Sharma, V., Gilhotra, R., Dhingra, D., Gilhotra, N., 2011. Possible underlying influence of p38MAPK and NF-kappaB in the diminished anti-anxiety effect of diazepam in stressed mice. *J. Pharmacol. Sci.* 116, 257-263.
153. Shephard, R.J., 2002. Cytokine responses to physical activity, with particular reference to IL-6: sources, actions, and clinical implications. *Crit Rev. Immunol.* 22, 165-182.
154. Siegel, A.L., Bledsoe, C., Lavin, J., Gatti, F., Berge, J., Millman, G., Turin, E., Winders, W.T., Rutter, J., Palmeiri, B., Carlson, C.G., 2009. Treatment with inhibitors of the NF-kappaB pathway improves whole body tension development in the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* 19, 131-139.
155. Sims, R.J., III, Weihe, E.K., Zhu, L., O'Malley, S., Harriss, J.V., Gottlieb, P.D., 2002. m-Bop, a repressor protein essential for cardiogenesis, interacts with skNAC, a heart- and muscle-specific transcription factor. *J. Biol. Chem.* 277, 26524-26529.
156. Skorokhod, A., Bachmann, J., Giese, N.A., Martignoni, M.E., Krakowski-Roosen, H., 2012. Real-time imaging cDNA-AFLP transcript profiling of pancreatic cancer patients: Egr-1 as a potential key regulator of muscle cachexia. *BMC. Cancer* 12, 265.
157. Spangenburg, E.E., Brown, D.A., Johnson, M.S., Moore, R.L., 2006. Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *J. Physiol* 572, 839-848.
158. Spencer, J.A., Eliazar, S., Ilaria, R.L., Jr., Richardson, J.A., Olson, E.N., 2000. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J. Cell Biol.* 150, 771-784.
159. Steinacker, J.M., Wang, L., Lormes, W., Reißnecker, S., Liu, Y., 2002. Strukturanpassungen des Skelettmuskels auf Training. *Dtsch Z Sportmed* 53, 354-360.
160. Strait, K., Li, Y., Dillehay, D.L., Weitzmann, M.N., 2008. Suppression of NF-kappaB activation blocks osteoclastic bone resorption during estrogen deficiency. *Int. J. Mol. Med.* 21, 521-525.
161. Sukhatme, V.P., Cao, X.M., Chang, L.C., Tsai-Morris, C.H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T., et al., 1988. A zinc finger-encoding gene

- coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53, 37-43.
162. Sun,S.C., 2011. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res.* 21, 71-85.
163. Tajbakhsh,S., 2009. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J. Intern. Med.* 266, 372-389.
164. Taylor,S.C., Posch,A., 2014. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed. Res Int.* 2014, 361590.
165. Thanos,D., Maniatis,T., 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80, 529-532.
166. Tisdale,M.J., 2000. Biomedicine. Protein loss in cancer cachexia. *Science* 289, 2293-2294.
167. Van,G.D., Damrauer,J.S., Jackman,R.W., Kandarian,S.C., 2009. The IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy. *FASEB J.* 23, 362-370.
168. Vella,L., Caldow,M.K., Larsen,A.E., Tassoni,D., la Gatta,P.A., Gran,P., Russell,A.P., Cameron-Smith,D., 2012. Resistance exercise increases NF-kappaB activity in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 302, R667-R673.
169. Vogiatzis,I., Simoes,D.C., Stratakos,G., Kourepini,E., Terzis,G., Manta,P., Athanasopoulos,D., Roussos,C., Wagner,P.D., Zakynthinos,S., 2010. Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD. *Eur. Respir. J.* 36, 301-310.
170. Wang,Y., Pessin,J.E., 2013. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab Care* 16, 243-250.
171. White,R., Morganstein,D., Christian,M., Seth,A., Herzog,B., Parker,M.G., 2008. Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett.* 582, 39-45.
172. Wiedmann,B., Sakai,H., Davis,T.A., Wiedmann,M., 1994. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370, 434-440.
173. Wolf,J., Rose-John,S., Garbers,C., 2014. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine* 70, 11-20.
174. Xia,J., Scherer,S.W., Cohen,P.T., Majer,M., Xi,T., Norman,R.A., Knowler,W.C., Bogardus,C., Prochazka,M., 1998. A common variant in PPP1R3 associated with insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* 47, 1519-1524.
175. Xu,L.G., Li,L.Y., Shu,H.B., 2004. TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 17278-17282.
176. Yamaki,T., Wu,C.L., Gustin,M., Lim,J., Jackman,R.W., Kandarian,S.C., 2012. Rel A/p65 is required for cytokine-induced myotube atrophy. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 303, C135-C142.
177. Yang SB, ,Y.N., Tang Q, Zhang MX, 2015. Expression and regulation of MuRF-1 and atrogin-1 are required for skeletal muscle atrophy. *Austin J Anat* 2, 1028.
178. Yang,W.L., Wang,J., Chan,C.H., Lee,S.W., Campos,A.D., Lamothe,B., Hur,L., Grabiner,B.C., Lin,X., Darnay,B.G., Lin,H.K., 2009. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 325, 1134-1138.
179. Zhang,J.J., Xu,Z.M., Chang,H., Zhang,C.M., Dai,H.Y., Ji,X.Q., Li,C., Wang,X.F., 2011. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates nuclear factor-kB activation, cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic epithelial cells. *Gynecol. Obstet. Invest* 72, 163-168.

180. Zhao,Y., Bruemmer,D., 2010. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1535-1541.
181. Zhou,A., Scoggin,S., Gaynor,R.B., Williams,N.S., 2003. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 22, 2054-2064.

9. Abkürzungsverzeichnis

ACTN3	<i>alpha actinin 3</i>
AK	Antikörper
AKT	aktivierte Proteinkinase B
AP	<i>activating protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF3	<i>activating transcription factor 3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CD40	<i>cluster of differentiation 40</i>
Ct	<i>cycle treshold</i> , dt. Schwellenwert-Zyklus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX4	<i>cytochrome c oxidase subunit 4</i>
CPT1	<i>carnitine palmitoyltransferase I</i>
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
Cu ⁺	Kupferionen
CXCL1/5	<i>chemokine (cxc-motif) ligand 1/5</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , dt. Desoxyribonukleinsäure (DNS)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGR1	<i>early growth factor 1</i>
EPS	Elektrische Pulsstimulation
ex	<i>exercise</i>
FBS	Fötales Kälberserum, <i>fetal bovine serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
Gp130	Glykoprotein 130
HDAC1	<i>histone deacetylases 1</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	<i>hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase</i>
IFN-γ	Interferon-γ

IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
I κ B	Inhibitorische-NF- κ B-Proteine
I κ B- α	I κ B-Kinase- α
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL-1/6	Interleukin-1/6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
LD	letale Dosis
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LT β	<i>Lymphotoxin β</i>
MAFF	<i>v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog f</i>
mATPase	myofibrillären Adenosintriphosphatase
MAP3K	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinases</i>
MB	Myoglobin
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MSTN	Myostatin
m-Tor	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MURF1	<i>muscle ring-finger protein-1</i>
MyD	Myogener Faktor 3
MyHC	<i>myosin heavy chain</i>
MyLC	<i>myosin light chain</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NEMO	NF- κ B <i>essential modifier</i>
NES	<i>nuclear export sequenze</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NIK	NF- κ B- <i>inducing kinase</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NR4A3	<i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 3</i>
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Pax	<i>paired box</i> Transkriptionsfaktoren
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline mit Tween</i>

PDK4	<i>pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4</i>
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PGC-1 α/β	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α/β</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PPP1R3	<i>protein phosphatase 1 regulatory subunit 3</i>
qPCR	quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RHD	<i>rel homology domain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , dt. Ribonukleinsäure
RIP2	<i>receptor interacting protein 2</i>
ROS	<i>reactive oxygen stress</i>
RT	Raumtemperatur
SDHD	<i>succinate dehydrogenase complex subunit D</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS	Natriumlaurylsulfat
sed	<i>sedentary</i>
SG-Puffer	Sammelgelpuffer
skNAC	<i>skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex alpha</i>
Smyd1	<i>set and mynd domain containing 1</i>
TAD	transkriptionsaktivierende Domäne
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAK	<i>transforming growth factor β-activated kinase</i>
TBP	<i>tata box binding protein</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG-Puffer	Trenngelpuffer
TLR	toll-like Rezeptor
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor</i>
TRAF2/6	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor 2/6</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
TWEAK	<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
UCP3	<i>uncoupling protein 3a</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZFP36	<i>zinc finger protein 36</i>

10. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Mein außerordentlicher Dank geht dabei an Frau Prof. Dr. Barbara Munz für die vielseitige Unterstützung und äußerst gute und angenehme fachliche sowie menschliche Betreuung bei der Bearbeitung dieses interessanten Forschungsthemas. Ihre stets konstruktive und hilfreiche Kritik sowie die Beratung und ihr Engagement bei den einzelnen Tierversuchseinheiten und Experimenten waren äußerst wertvoll für den Verlauf und das Fortschreiten meiner Arbeit.

Ein besonderes Dankschön geht an Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier für die Übernahme der Betreuung am Fachbereich der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin. Trotz der örtlichen Entfernung stand er jederzeit für Fragen zur Verfügung und bereicherte meine Arbeit durch seine konstruktive Kritik.

Vielen Dank an meine Betreuerin Frau Dr. Angelika Schmitt, welche mich in alle Labormethoden eingewiesen hat. Nicht nur bei nächtlichen Mäusetrainings- und Präparationseinheiten stand sie mir hilfreich zur Seite. Eine weitere wichtige Dankesadresse ist das gesamte Team der AG Munz. Dabei geht ein ganz besonderer Dank an Herrn Thomas Beiter, welcher mir bei Problemen und Fragen zur Seite stand und mich fachlich sehr unterstützt hat.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Mai Le, welche mich ausführlich und geduldig in das Handling von und die Methoden an Versuchstieren eingeführt hat. Ein herzliches Dankeschön geht zudem an die Tierpfleger der HNO-Tierhaltung, insbesondere an Alisha Huff, welche unsere Mäuse gut betreut und bei räumlichen Engpässen immer eine Lösung gefunden haben. Dies verhinderte eine Stagnation der Mäuseversuche.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich stets bestärkt und immer an mich geglaubt haben. Vielen Dank für eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht und euer unendliches Vertrauen. Ein großes Dankeschön geht auch an meinen Freund Nino Brändle, der mir in stressigen Zeiten immer den Rücken frei gehalten hat und bei Problemen jeglicher Art für mich da war. Vielen Dank an meine Korrekturleserin Frau Janine Haug. Sie las meine Dissertation mit größter Sorgfalt und hat mit ihren Anregungen und Korrekturen meine Arbeit auf sprachlicher Ebene bereichert.

11. Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 21.11.2017

Anne Lena Haug



9 783863 878801
mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-880-1