

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Sport- und Rehabilitationsmedizin
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jürgen M. Steinacker

**Cross-over-Studie zur Evaluation des Einflusses eines Ausdauer-
bzw. Krafttrainingsprogrammes auf die Isoformen der
Laktatdehydrogenase**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Ulm

Laura Isabella Wuschek
geboren in Schongau

2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jürgen M. Steinacker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Enrico Calzia

Tag der Promotion: 15. April 2021

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Analyse interindividueller Unterschiede durch molekulare Leistungsdiagnostik. 1	
1.2 Allgemeine Anpassungsreaktionen der humanen Skelettmuskulatur auf Trainingsreize	2
1.3 Aktueller Forschungsstand: Analyse der muskulären Genexpression mittels Hochdurchsatzverfahren (DNA-Microarrays).....	3
1.4 Mechanismen der Energiebereitstellung der Muskelzelle: aerob, anaerob alaktazid und anaerob laktazid	6
1.5 Zusammenhang zwischen PGC-1 α , Laktatdehydrogenase (LDH) und dem Laktatstoffwechsel.....	9
1.6 Forschungsdefizit	11
1.7 Hypothesengenerierung mittels Genexpressionanalyse	12
1.8 Hypothese	13
1.9 Fragestellungen.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Methoden.....	15
2.1.1 Studiendesign	15
2.1.2 Muskelbiopsien.....	20
2.1.3 Quantitative Real-time PCR (qPCR).....	21
2.1.4 Western Blot	23
2.1.5 Statistische Auswertung.....	32
2.2 Material.....	33
2.2.1 Leistungsdiagnostik und Trainingsstudie	33
2.2.2 Probenbearbeitung und Analyse im Labor	33
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Leistungsdiagnostik	35
3.1.1 Ausdauerdiagnostik	35
3.2 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR)	35
3.2.1 Expressionsunterschiede PGC-1 α	35
3.2.2 Expressionsunterschiede LDH-A	42
3.2.3 Expressionsunterschiede LDH-B	47
3.2.4 LDH-A/LDH-B-Ratio	53
3.3 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot	58
3.3.1 LDH-A Proteinexpression	58
3.3.2 LDH-B Proteinexpression	60
3.3.3 LDH-A/ LDH-B Ratio.....	62

4	Diskussion	64
4.1	PGC-1 α : Expressionssteigerung durch akute Belastung sowie Ausdauertraining	65
4.2	LDH-A: Expressionssteigerung durch Akutbelastung und Beginn des Trainings, unabhängig von der Trainingsmodalität	69
4.3	LDH-B: ausgeprägtere Expressionssteigerung durch Ausdauertraining verglichen mit Krafttraining	72
4.4	LDH-A/LDH-B-Ratio: vielversprechender Marker für Ausdauertrainingszustand?	73
4.5	Zusammenhang Fasertyp und LDH-Isoenzymvorkommen	74
4.6	Proteinexpression	75
4.7	Antworten auf die ursprüngliche Fragstellung	76
4.8	Limitationen	77
4.9	Ausblick.....	77
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	81
7	Abbildungsverzeichnis	85
8	Anhang	88
8.1	Aushang Probanden.....	88
8.2	Bilddateien der eingescannten Röntgenfilme des Western Blot.....	89
8.3	Schematische Darstellung der Ergebnisse	92

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAM	Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport
BCA	Bicinchoninsäure, bichinonic acid
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Rinderalbumin, bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
EIF3J	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HERITAGE family studie	HEalth, RIsk factors, exercise Training And GENetics family studie
HRP	horseradish peroxidase
IAS	individuellen anaeroben Schwelle
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht in kg
KLF4	Kruppel-like factor 4
LDH	Laktatdehydrogenase
LDH-A	Laktatdehydrogenase A
LDH-A/LDH-B-Ratio	Ratio Laktatdehydrogenase A zu Laktatdehydrogenase B
LDH-B	Laktatdehydrogenase B
LMO4	Lim domain only 4
m ²	Quadratmeter
MDH1	Malate dehydrogenase 1
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter

mRNA	messenger ribonucleic acid
ng	Nanogramm
OCT3	organic cation transporter 3
PCR	Polymerasekettenreaktion, Polymerasekettenreaktion
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PPAR	der peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	2.1.3 Quantitative Real-time PCR
RNA	ribonucleic acid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SLC16A7	Solute carrier family 16, member 7
SLC22A3	solute carrier family 22 member 3
TBS	tris-buffered saline
Untereinheit M	muscle subunit
UTRN	Utrophin
VO ₂ max	maximale Sauerstoffaufnahme

1 Einleitung

In der Vorbereitung auf einen Wettkampf wird im Spitzensport auf unterschiedlichste Weise trainiert. Ziel dabei ist es, durch möglichst gezieltes Training eine größtmögliche Leistungssteigerung zu erreichen, die ein optimales Abschneiden beim Wettkampf ermöglicht.

Um dieses Ziel zu erreichen, sind Trainingskonzepte notwendig, die genau auf das Wettkampfziel, den momentanen Leistungsstand des Athleten und dessen Ressourcen abgestimmt sind.

Es gibt vielzählige Methoden den momentanen Leistungsstand eines Athleten zu erheben und das Training bis zum gewünschten Ziel zu planen. Eine der am weitesten verbreiteten Methoden, die vor allem im Ausdauersport genutzt wird, ist die Laktat-Leistungsdiagnostik. Hierbei wird in einem Stufentest die Laktatkonzentration des Kapillarblutes mit der Belastungsstärke und den Vitalparametern korreliert. Aus den so gewonnenen Werten können Laktatleistungskurven generiert werden. Hieraus kann die der gewünschten Belastungsintensität entsprechende Leistung abgelesen werden. Mit der daraus gewonnen Information, können die zu absolvierenden Trainingseinheiten so konzipiert werden, dass sie den gewünschten Intensitäten entsprechen. Auf diese Weise kann das Training gesteuert werden und zum Erreichen des Trainingszieles beitragen.

1.1 Analyse interindividueller Unterschiede durch molekulare Leistungsdiagnostik

Bei einem genormten Trainingsprogramm, dessen Belastungsintensität sich an den individuellen Ergebnissen einer (Laktat-)Leistungsdiagnostik orientiert, kommt es interindividuell zu beträchtlichen Unterschieden im Leistungszuwachs. Diese interindividuellen Unterschiede in den durch Training erreichten Anpassungsreaktionen sind Gegenstand der molekularen Leistungsdiagnostik. Hierbei handelt es sich um ein junges Forschungsgebiet, welches sich am Anfang eines spannenden Weges mit vielen ungeklärten Fragen, Herausforderungen und großem Potenzial befindet. Die molekulare Leistungsdiagnostik beschäftigt sich unter anderem mit Veränderungen der mRNA- (messenger ribonucleic acid-) sowie Proteinexpression diverser leistungsrelevanter Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Transportproteine etc. in der Skelettmuskulatur. Gesucht wird nach reagiblen Markern, die im Zusammenhang mit einer langfristigen Anpassung auf

gezielte Trainingsreize als Prädiktoren für Leistungszuwächse dienen können. Hierdurch gewonnene Erkenntnisse sollen im weiteren Verlauf auf systemische Faktoren, deren Bestimmung mit weniger invasiven Methoden (z.B. im Blut) möglich ist, übertragen werden. Auf Grund der Vielzahl an möglicherweise relevanten Genen ist die Analyse mittels Microarrays/Genchips (z.B. Affymetrix™) eine gern genutzte Untersuchungsmethode in diesem Feld. Hinzu kommen die vielzähligen und komplexen Regulationsmechanismen der Genexpression, die zwischen einem Gen und dem „fertigen“ Protein stehen. In jedem Prozessierungsschritt kann es zu einer breiten Auswahl an Regulationen kommen. Durch Regulation auf Ebene der Transkription, RNA-Prozessierung, Transport, Translation und Protein-Prozessierung entsteht ein komplexes Netzwerk mit unzähligen Stellschrauben. Diese sind für die Zelle von enormer Bedeutung um flexibel auf interne sowie externe Reize reagieren zu können.

Die molekulare Leistungsdiagnostik ermöglicht eine Analyse der Vorgänge auf molekularer Ebene. Durch Analyse der Vorgänge in der Skelettmuskulatur und dessen Genexpressionsprofilen erhofft man sich Einsicht in die Regulationsmechanismen des Skelettmuskels und dessen Anpassungsreaktionen auf Trainingsreize.

Ein Ziel ist es, die Möglichkeiten der individuellen Trainingssteuerung durch ein besseres Verständnis der zellulären Anpassungsreaktionen und ihrer Einflüsse auf die Energiebereitstellung ausbauen und verbessern zu können.

1.2 Allgemeine Anpassungsreaktionen der humanen Skelettmuskulatur auf Trainingsreize

Die hohe Anpassungsfähigkeit der Muskulatur bietet die Grundlage, für die durch Training induzierten positiven Effekte. Muskelgewebe reagiert auf Reize wie beispielsweise Ausdauer- und Krafttraining (Hoppeler 1986), Inaktivität (Bodine 2013), Hypoxie (Hoppeler et al. 2008), Schwerelosigkeit (Desplanches 1997), Kälte (Buser et al. 1982) und Nährstoffangebot (Vogt et al. 2003). Diese Reize führen in der Muskulatur zu Anpassungsreaktionen, die eine optimierte Ausgangsposition für erneute Reize ermöglichen (Egan et al. 2013). Der Muskel ist stets bemüht akute Anpassungen vorzunehmen, investiert jedoch gleichzeitig in längerfristige Prozesse, um für weitere Reize derselben Art besser vorbereitet zu sein. Beispiele hierfür sind die Verbesserung der neuromuskulären Verbindungen, Verbesserung des Sauerstoffangebotes durch

Angiogenese, Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung und des Muskelquerschnittes, Veränderung der Energiegewinnung und Bereitstellung.

Die erzielten Veränderungen sind abhängig von der Trainingsart, Trainingsmodalität, dem Trainingsumfang, dem Trainingsstatus, der Wahl und Zusammenstellung der einzelnen Trainingsreize sowie den individuellen Voraussetzungen. Während Ausdauertraining zu vielschichtigen Veränderungen in der Energiebereitstellung führt, wird durch Krafttraining vorwiegend die Proteinsynthese angekurbelt und durch Hypertrophie eine Erhöhung der maximalen Kraftentwicklung erreicht. Ein Zusammenhang zwischen dem Trainingsstimulus und den durch ihn ausgelösten Veränderungen in der Genexpression ist belegt, aber noch nicht abschließend verstanden.

Zusätzlich zu diesen Reizen, die von außen auf jedes Individuum und somit dessen Körper einwirken, spielen die individuellen Voraussetzungen wie z.B. Geschlecht, Herkunft, Alter, bisher durchgeführtes Training und Genetik eine große Rolle.

1.3 Aktueller Forschungsstand: Analyse der muskulären Genexpression mittels Hochdurchsatzverfahren (DNA-Microarrays)

In der Literatur finden sich bereits Studien, die durch Zuhilfenahme der mittels DNA- (deoxyribonucleic acid-) Microarrays aus der Muskulatur gewonnenen Daten eine Bewertung von körperlichem Training auf die Genexpression vornehmen. Sie beschäftigen sich mit den durch akute Belastung oder Training ausgelösten Veränderungen in der muskulären Genexpression.

Stepito et al. 2009 analysierten in ihrer Querschnittsstudie die Auswirkung von seit längerem ausgeübtem Ausdauer- bzw. Krafttraining auf die Genexpressionsmuster des menschlichen Skelettmuskels (Stepito et al. 2009). Sie untersuchten und verglichen hierzu die Genexpression in Muskelproben von Probanden, die über mindestens 8 Jahre regelmäßig Ausdauer- oder Krafttraining betrieben haben, mit denen von untrainierten Probanden mittels cDNA-Microarray-Analysen (complementary deoxyribonucleic acid). Verglichen wurden Muskelproben, welche nach einer Ruhephase von 24 Stunden gewonnen wurden. 263 Gene waren im Vergleich zwischen trainierter und untrainierter Muskulatur unterschiedlich exprimiert, die Expressionsdaten zwischen ausdauer- und krafttrainierter Muskulatur unterschieden sich in 21 Genen. In der Gruppe der 6 mittels PCR-Analyse (Polymerasekettenreaktion) bestätigten Gene zeigte sich eine im Gruppenvergleich höhere Expression der Gene EIF3J (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J), LMO4 (Lim domain only 4) und UTRN (Utrophin) in der

krafttrainierten Muskulatur. **LDH-B (Laktatdehydrogenase B)**, MDH1 (Malate dehydrogenase 1) und SLC16A7 (Solute carrier family 16 member 7) waren in der ausdauertrainierten Muskulatur verglichen mit der krafttrainierten Muskulatur höher exprimiert.

Gene, die in Zusammenhang mit der Muskelstruktur und deren Entwicklung stehen, waren bei trainierten Probanden höher exprimiert und es bestand eine Korrelation zwischen Leistung und Expression. Auch zwischen der VO₂max (maximale Sauerstoffaufnahme) und Genen, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen/oxidativen Kapazität stehen, konnte eine Korrelation gezeigt werden. Die Gruppe dieser Gene war in der Gruppe der Ausdauertrainierten erhöht, bei den Krafttrainierten erniedrigt.

Die Arbeitsgruppe gelangte zu dem Schluss, dass langjähriges Training die Genexpression innerhalb funktionell wichtiger Gruppen im Muskel beeinflusst und somit Teile des durch Training ausgelösten Anpassungsprozesses widerspiegelt.

Die erste Analyse der Veränderungen in der globalen mRNA Expression im Erholungszeitraum nach einer akuten Ausdauerbelastung auf dem Fahrradergometer führten Mahoney et al. 2005 durch. Sie untersuchten die Muskelbiopsien von 4 zufällig ausgewählten untrainierten Teilnehmern der Studie hinsichtlich Veränderungen in der Genexpression vor Belastung, 3 Stunden nach Belastungsende und nach 48 Stunden. Die globale mRNA Expression wurde mittels cDNA-Microarray zwischen den Zeitpunkten innerhalb jedes Probanden verglichen. Insgesamt zeigten 118 Gene eine erhöhte Expression 3 Stunden nach Belastung, 8 Gene eine verminderte Expression. Nach 48 Stunden verringerte sich die Zahl der Gene mit gesteigerter Expression auf 29 und 5 Gene waren geringer exprimiert. Die reagiblen Gene gehörten u.a. zu funktionellen Gruppen mit Bedeutung im Stoffwechsel, der mitochondrialen Biogenese, Antwort auf oxidativen Stress, Elektronentransport über Membranen, Apoptose, Wachstum und Differenzierung und transkriptioneller Aktivierung. Somit ermöglichen die erhobenen Daten einen Einblick in die zur Wiederherstellung der Homöostase nach Belastung ausgelösten transkriptionellen Vorgänge und den durch eine akute Belastung ausgelösten Beitrag zur Trainingsadaptation.

Durch Untersuchungen zeigten Neubauer et al. 2014, dass auch die für eine muskuläre Adaptation notwendigen Veränderungen der extrazellulären Matrix auf einer Veränderung der mit ihr in Zusammenhang stehenden Genexpression beruhen. Daten, die diese Rückschlüsse zuließen, konnten durch die Untersuchung von Muskelbiopsien, welche 3, 48 und 96 Stunden nach einer akuten Belastung ausdauertrainierter Probanden, mit bewusst hoch gewählten Belastungsintensitäten, gewonnen werden. Die 102 Gene mit

erhöhter Expression 3 Stunden nach Belastung gehören u.a. zu Gruppen die in Verbindung mit der Aktivierung von Chaperonen und der Immunantwort stehen. Unter den 19 Genen, die nach 48 Stunden vermehrt exprimiert wurden, befanden sich 2 mit Verbindung zur Umstrukturierung des Aktinzytoskelettes. Unter den 80 Genen, mit erhöhter Expression nach 96 Stunden, waren Gene im Bereich der Chemokinsignale, Umgang mit zellulärem Stress und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix. Dies waren die ersten Daten, die eine Beobachtung der durch akuten Stress, Erholung und Anpassung ausgelösten molekularen Vorgänge in der menschlichen Muskulatur über 48 Stunden hinaus ermöglichten. Sie zeigten, dass die in der Muskulatur nach starker Beanspruchung ablaufenden Prozesse auch nach 96 Stunden noch nicht abgeschlossen sind.

Mit den unmittelbar durch eine einmalige Akutbelastung hervorgerufenen Veränderungen auf Ebene der Genexpression beschäftigten sich Catoire et al. 2012. Vor und unmittelbar nach einer einstündigen Akutbelastung auf dem Fahrradergometer, bei 50% der im Eingangstest maximal erreichten Wattstufe, wurden Muskelbiopsien gewonnen. Dies war die erste Studie, deren Fokus auf der unmittelbaren durch Belastung ausgelösten Veränderungen im menschlichen Muskel lag. Eine weitere Besonderheit bestand darin, dass die Belastung auf dem Fahrradergometer einbeinig erfolgte. So konnte zusätzlich der Einfluss auf den ruhenden kontralateralen Muskel untersucht und mit dem aktiv arbeitenden verglichen werden. Durch Vergleich innerhalb eines Individuums gelang hierbei die Minimierung interindividueller Störgrößen bedingt durch interindividuelle Unterschiede. Die 3 Gene mit der höchsten Expressionssteigerung im arbeitenden Muskel, gehörten alle zu der NR4A-Familie. Auch in dem nicht aktiv arbeitenden Muskelgewebe der Gegenseite wurde eine Veränderung der Genexpression nachgewiesen. Die Autoren gehen davon aus, dass dieser Effekt auf Veränderungen zirkulierender Faktoren basiert. Die betroffenen Gene stehen in Zusammenhang mit der peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-Signaltransduktion bzw. sind Ziele von PPAR- α . Als mögliches Beispiel hierfür werden freie Fettsäuren aufgeführt.

Timmons et al. 2005 rekrutierten für ihre Trainingsstudie 24 untrainierte Männer. Diese absolvierten ein sechswöchiges Ausdauertraining. Vor Trainingsbeginn und 24 Stunden nach der letzten Trainingseinheit wurden Muskelbiopsien gewonnen. Für die anschließenden Expressionsanalysen wurden die 8 Teilnehmer mit der größten Leistungssteigerung ausgewählt. Die jeweils 2 Muskelproben dieser 8 Teilnehmer, genannt High-Responder, wurden mittels Affimetrix™ Microarray untersucht. Ergebnis der Studie war die Erstellung des ersten transkriptomweiten mRNA Expressionsprofils des Skelettmuskels nach Ausdauertraining von Probanden mit besonders gutem Ansprechen

auf das absolvierte Trainingsprogramm. Eine erhöhte Expression, verglichen mit dem Ausgangswert vor Trainingsbeginn, wurde bei Genen gefunden, die in Zusammenhang mit der Reorganisation der Extrazellulärmatrix oder dem Calciumtransport stehen.

Einen Schritt weiter machten Timmons et al. 2010 in dem sie in einer prospektiven Trainingsstudie einen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der Probanden auf das absolvierte Trainingsprogramm und deren Veränderungen im Genexpressionsmuster herstellten. Grundlage der Studie bildeten 3 Probandengruppen unterschiedlicher Fitness: untrainierte, trainierte und Teilnehmer der HERITAGE (HEalth, RIsk factors, exercise Training And GENetics) family studie (Bouchard et al. 1999). Das absolvierte Trainingsprogramm unterschied sich von Gruppe zu Gruppe. Es gelang ihnen 29 Prediktorgene zu identifizieren. Diese seien ihrer Meinung nach verantwortlich für die interindividuellen Unterschiede. Zu den beschriebenen Genen gehören beispielsweise ID3 (inhibitor of DNA binding 3), KLF4 (Kruppel-like factor 4), SLC22A3 (Solute carrier family 22 member 3) bzw. OCT3 (organic cation transporter 3) und H19. Besonders hervorzuheben ist, dass hierzu weder das sonst vielfach beschriebene PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) oder AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) zählen.

1.4 Mechanismen der Energiebereitstellung der Muskelzelle: aerob, anaerob alaktazid und anaerob laktazid

Der Muskelzelle stehen zur Energiebereitstellung zwei Hauptmechanismen zur Verfügung: die aerobe oder die anaerobe Energiegewinnung. Bei der aeroben Energiegewinnung wird in den Mitochondrien unter Sauerstoffverbrauch ATP (Adenosintriphosphat) gebildet. Dies kann entweder aus Kohlenhydraten mittels aerober Glykolyse oder aus Fetten über Lipolyse und β -Oxidation erfolgen. Im Falle der Glykolyse wird das entstandene Pyruvat weiter zu Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A) verstoffwechselt. Als Endprodukt der β -Oxidation entsteht ebenfalls Acetyl-CoA. Dieses wird über den Citratzyklus weiter abgebaut und die so entstandenen Substrate der Atmungskette zugeführt. Mithilfe des über den Verlauf der Atmungskette aufgebauten Potentials wird schließlich ATP aus ADP (Adenosindiphosphat) regeneriert. Dieses steht dann z.B. den Muskelzellen zur Verfügung. Im Gegensatz hierzu läuft die anaerobe Energiegewinnung ohne Sauerstoffverbrauch im Zytosol der Zelle ab. Hierbei unterscheidet man die anaerobe-alaktazide von der anaeroben-laktaziden Energiegewinnung. Bei der anaeroben Glykolyse wird Pyruvat auf Grund des Sauerstoffmangels, nicht wie oben beschrieben zu Acetyl-CoA verstoffwechselt

und in den Citratzyklus eingeschleust, da hierzu Sauerstoff notwendig wäre. Stattdessen wird Pyruvat unter Bildung von Laktat reduziert. Diese Reaktion wird enzymatisch durch die Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert. So kommt es zu keiner Anhäufung des Zwischenproduktes Pyruvat und die Glykolyse kann weiterhin ablaufen und somit ATP generieren.

LDH ist im Energiestoffwechsel der Muskelzelle für die Verstoffwechslung von Pyruvat zu Laktat und vice versa notwendig. Diese erfolgt enzymatisch durch verschiedene Isoformen der LDH. Diese Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus den verfügbaren Untereinheiten: Untereinheit M (muscle subunit) und Untereinheit H (heart subunit). Die Untereinheiten bilden eine tetrameren Komplex, der je nach Zusammensetzung LDH 1-5 genannt wird (Dawson et al. 1964).

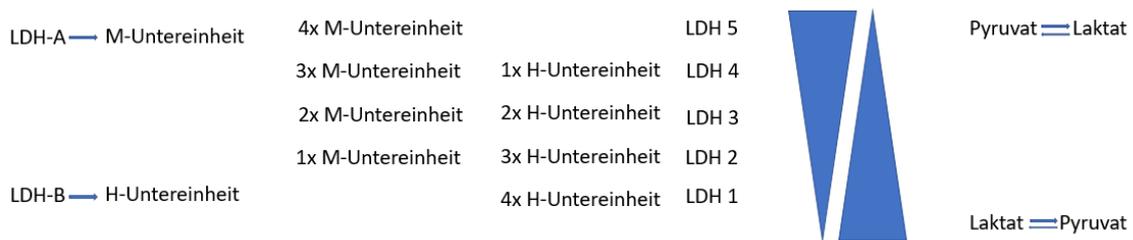


Abbildung 1: Schema der funktionellen Aktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH)

Die LDH-M-Untereinheit (muscle), welche die Reduktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert, wird auf mRNA-Ebene vom LDH-A Gen kodiert. LDH-B kodiert für die LDH-H-Untereinheit (heart), die zuständig für die Oxidation von Laktat zu Pyruvat ist (Baba und Sharma 1971). Je nach enthaltenen Untereinheiten katalysiert das Enzym LDH bevorzugt die Reduktion oder Oxidation.

Entsprechend ihrer Kontraktionseigenschaften und Einsatzbereiche variiert die Energiebereitstellung der Muskelzellen. Hierbei besteht bedingt eine Korrelation zu den unterschiedlichen Muskelfasertypen. Eine Möglichkeit der Gruppierung erfolgt anhand ihrer metabolischen Eigenschaften. Unterschieden werden fast-twitch glycolytic (FG), fast-twitch oxidative (FOG) und slow-twitch oxidative (SO) Fasern. Eine andere Einteilung beruht ausschließlich auf den unterschiedlichen Kontraktions- und Ermüdungseigenschaften. Unterschieden werden hierbei langsame Typ I (auch Slow-twitch-Fasern) von schnellen Typ II Fasern (auch Fast-twitch-Fasern). Typ I Fasern gewinnen ihre Energie vorwiegend aerob/oxidativ, hier besteht somit eine gute Übereinstimmung der Zuordnung. Dies gilt nicht für Typ II Fasern. Typ IIA und IIB Fasern zeigen zwar eine Tendenz zur aeroben bzw. anaeroben Energiegewinnung, diese ist aber

nicht stark genug, um eine Verbindung herzustellen. Der von Bárány 1967 beschriebene Zusammenhang der vorwiegend aerob/oxidativen Energiegewinnung von Typ I Fasern bzw. vorwiegend glykolytischen durch Typ II Fasern kann somit nur eingeschränkt übernommen werden. Hierzu passend sind die Aussagen verschiedener Arbeiten, dass trotz des Zusammenhangs zwischen Fasertyp und metabolischem Profil eine Änderung des metabolischen Profils ohne Änderung des Fasertyps möglich ist. Diese Anpassung erfolgt schneller und mit höherer Variabilität (Henriksson und Reitman 1977; Li et al. 2002; Pette und Staron 1990). Dies ist wichtig, da abhängig vom Trainingsstatus der Muskulatur, die Zusammensetzung aus den verschiedenen Typen von Muskelfasern variiert (Gauthier und Lowey 1979).

Je nach bevorzugter Energiegewinnung finden sich vorwiegend Enzyme des jeweiligen Stoffwechselweges. In einer ausdauertrainierten Muskulatur finden sich somit verhältnismäßig vermehrt Enzyme, die eine Rolle in der aeroben Energiegewinnung spielen. Dies manifestiert sich auch auf der Ebene der Genexpression.

In dem von uns im Vorfeld durchgeführten Vergleich (Studienteil I der BAM-Studie; („Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport“) nicht Teil dieser Dissertation) der Expressionsdaten in Muskelproben trainierter mit untrainierter Probanden zeigte sich dies besonders deutlich im Bereich der Transkripte, die für die beiden Isoformen der LDH kodieren. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen ausdauertrainierter und untrainierter Skelettmuskulatur gemessen werden. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich eine niedrigere Expression von LDH-A und eine erhöhte Expression von LDH-B in der Gruppe der ausdauertrainierten Probanden. Eine Akutbelastung verursachte keine signifikanten Expressionsunterschiede.

Passend hierzu sind die Ergebnisse von Plomgaard et al. 2006. Sie konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass im menschlichen Skelettmuskel eine positive Korrelation zwischen dem Anteil an MHC (major histocompatibility complex) Typ I Fasern und der Menge an LDH-B mRNA besteht. Ebenso besteht eine negative Korrelation zur vorhandenen LDH-A mRNA. LDH-A mRNA ist im Musculus triceps brachii (hoher Anteil an Typ II Fasern) bis zu 3-fach so hoch exprimiert wie im Musculus soleus (hoher Anteil Typ I Fasern). Eine 3-fach höhere Expression von LDH-B mRNA verglichen mit dem Musculus triceps brachii findet sich hingegen im Musculus soleus oder Musculus vastus lateralis.

1.5 Zusammenhang zwischen PGC-1 α , Laktatdehydrogenase (LDH) und dem Laktatstoffwechsel

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) wird in der Literatur häufig mit den in der Skelettmuskulatur durch Ausdauertraining hervorgerufenen Anpassungsreaktionen in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind strukturelle Veränderungen durch Verbesserung der Versorgung mit Sauerstoff durch Angiogenese (Arany et al. 2008), Verbesserung der neuromuskulären Verbindungen (Handschin et al. 2007b), Veränderung des Fasertypverhältnisses (Li et al. 2002) und des Calciumtransportes (Summermatter et al. 2012). In Bezug auf den Muskelmetabolismus induziert es die mitochondriale Biogenese (Summermatter et al. 2012; Lin et al. 2005) und die Fettoxidation (Summermatter et al. 2011).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass durch erhöhte PGC-1 α Expression ein ausdauertrainierter Phänotyp induziert werden könnte. Diese These unterstützen die Untersuchungen von Calvo et al 2008. Durch muskelspezifische Erhöhung von PGC-1 α konnte die Arbeitsgruppe eine erhöhte VO₂max und höhere Leistungsfähigkeit (in freiwilligen wie auch forcierten Laufradtests) der Mäuse erreichen (Calvo et al. 2008). Zwischen der Leistungsfähigkeit im Ausdauerbereich und der Laktathomöostase besteht eine enge Verbindung (Cairns 2006). Somit wäre ein Einfluss von PGC-1 α auch hier denkbar. Im Mausmodell konnte eine verringerte Laktatkonzentration sowohl in Ruhe wie nach Belastung in Zusammenhang mit erhöhten PGC-1 α Werten beobachtet werden, wobei die Mäuse jedoch einer schlechter Leistung erbrachten (Wende et al. 2007).

Summermatter et al. 2013 beschäftigten sich mit der bis dahin ungeklärten Frage, ob diese Beobachtung auf eine verringerte Laktatproduktion oder einen erhöhten Laktatabbau bzw. eine Kombination aus beidem zurückzuführen ist. In PGC-1 α transgenen-Mäusen (PGC-1 α in Skelettmuskulatur überexprimiert) konnte gezeigt werden, dass bei ihnen sowohl die Laktatproduktion vermindert, wie auch der Laktatabbau zu Pyruvat gesteigert ist.

Untersuchungen an den aus diesen transgenen Mäusen gewonnenen Muskelhomogenaten mittels nativer Gelelektrophorese zeigten ein erhöhtes Vorkommen von LDH 1-3 (bestehend aus subunit H (LDH 1), kodiert durch LDH-B plus subunit M (LDH 2: 3HM, LDH 3: 2H2M), kodiert durch LDH-A), sowie eine Verringerung der Isoform LDH 5 (bestehend aus subunit M, kodiert durch LDH-A) im Vergleich mit Wildtypmäusen. Auf mRNA-Ebene konnte hierzu passend eine verminderte Expression von LDH-A und eine erhöhte LDH-B Expression in der Muskulatur nachgewiesen werden. Dies erklärt die oben beschriebene Verschiebung in der Zusammensetzung der LDH-Tetramere. Im weiteren

Verlauf wurde gezeigt, dass die verringerte LDH-A Menge, nicht im Sinne einer Suppression durch erhöhte LDH-B Menge zu werten ist. Sie tritt unabhängig von ihr auf. Auch zwischen der durch PGC-1 α erhöhten Laktataufnahme in die Muskelzellen mittels monocarboxyl transporter 1 (MCT1) und der Erhöhung von LDH-B bestehen keine Wechselwirkungen. Somit kann festgehalten werden, dass PGC-1 α durch 3 voneinander unabhängige Regulationen maßgeblich an der Steuerung der Laktathomöostase während Belastung beteiligt ist: verminderte LDH-A Expression, erhöhte LDH-B Expression und erhöhte Laktataufnahme mittels MCT1 in die Muskelzellen (Summermatter et al. 2013). In Ergänzung hierzu konnte anhand von PGC-1 α Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass diese, im Vergleich zu Wildtypmäusen, ein schlechteres Laktathandling (Akkumulation von Laktat im Blut, geringer Laktatclearance nach Injektion) zeigen.

Auf molekularer Ebene wird die oben beschriebene Muskeladaptation durch vermehrte Transkription von LDH-B durch Bindung der Transkriptionsfaktoren estrogen-related receptor- α (ERR α) und in geringerem Maße des retinoid X receptors (RXRs) an den LDH-B Promoter vermittelt (Summermatter et al. 2013). Über Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren fördert PGC-1 α die Transkription der LDH-B mRNA.

Zusammenfassend konnte anhand von PGC-1 α transgenen-Mäusen gezeigt werden, dass PGC-1 α die Expression von LDH-B erhöht und LDH-A reprimiert und dadurch Einfluss auf die Laktathomöostase während körperlicher Belastung hat. Durch diesen Regulationsmechanismus, erhält PGC-1 α eine Schlüsselrolle in der Regulation des Laktatstoffwechsels.

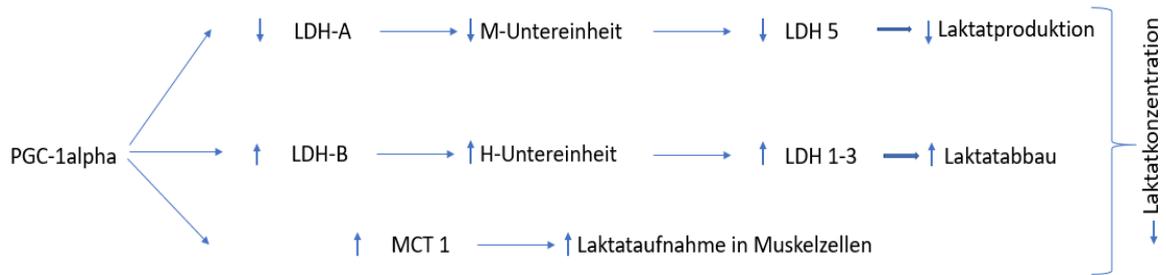


Abbildung 2: Einfluss von PGC-1 α auf die Regulation des Laktatstoffwechsels während Belastung

PGC-1 α führt zur Reduktion der Laktatkonzentration im Blut über drei voneinander unabhängige Mechanismen:

Verminderte Expression des LDH-A Gens führt zu verminderter Produktion von M-Untereinheiten (muscle) und somit zum Sinken der Anzahl vorhandener LDH 5 Komplexe, welche die Reduktion von Pyruvat zu Laktat katalysieren.

Erhöhte Expression des LDH-B Gens führt zur erhöhten Produktion von H-Untereinheiten (heart) und somit zum vermehrten Vorkommen von LDH 1-3 Komplexen, wodurch der Laktatabbau (Oxidation von Laktat zu Pyruvat) gesteigert wird.

Erhöhtes Vorkommen von MCT1 (monocarboxyl transporter 1) führt zu einer gesteigerten Laktataufnahme in die Muskelzellen.

PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; LDH-A = Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B

1.6 Forschungsdefizit

Bisherige Untersuchungen, welche die auf Ebene der Genexpression durch Training ausgelösten Veränderungen untersuchten (Stepito et al. 2009, Mahoney et al. 2005, Neubauer et al. 2014, Catoire et al. 2012, Timmons et al. 2005, Timmons et al. 2010), konzentrieren sich meist auf wenige Zeitpunkte oder eine spezifische Intervention. Nach unserem Kenntnisstand gab es bisher nur eine Untersuchung (Timmons et al. 2010), die eine Verlaufsbeobachtung, über 96 Stunden hinaus, innerhalb desselben Probandenkollektives, zulässt. Auch wurde bisher nicht untersucht, zu welchen Unterschieden die Teilnahme an einem Ausdauertrainingsprogramm verglichen mit einem Krafttrainingsprogramm bei denselben Probanden führt.

Um die durch Training ausgelösten Anpassungsreaktionen besser verstehen zu lernen und eine Verbindung mit den ihnen zugrundeliegenden Veränderungen auf Ebene der Genexpression herzustellen, sind diese Untersuchungen dringend notwendig. In unserer Studie werden diese Zusammenhänge aufgegriffen und untersucht. Wir untersuchten ein konstantes Probandenkollektiv (untrainierter, männlicher Probanden im Alter von 18-40 Jahren, VO₂max 30-50 ml/min/kg KG; siehe 2.1.1) hinsichtlich dessen Reaktion auf ein 8-wöchiges Ausdauer- und Krafttrainingsprogramm. Dies ermöglichte uns eine

Verlaufsbeobachtung, sowie den Vergleich zwischen den beiden Trainingsprogrammen. Unsere multizentrische Cross-over-Trainingsstudie ermöglicht erstmals eine Analyse der Genexpressionsveränderungen im Verlauf des Trainingsprogrammes durch wiederholte Probenentnahme während des Programmes. Auch ist ein Vergleich der Unterschiede zwischen den durch Ausdauertraining und Krafttraining ausgelösten Veränderungen innerhalb eines Probandenkollektives möglich. Eine Gegenüberstellung der Genexpressionsveränderungen als akute Reaktion auf eine Belastung und den langfristigen durch Training bewirkten Veränderungen, wird durch die Entnahme von Proben in Ruhe und nach akuter Belastung möglich.

Aufgrund der zahlreichen möglichen Ansatzpunkte der durch Training verursachten muskulären Anpassungen, ist es sinnvoll, sich auf einen Ausschnitt zu konzentrieren. Um eine Verbindung zur veränderten Genexpression herzustellen, sollte es sich hierbei um einen Mechanismus handeln, der sich auch in einer veränderten Genexpression widerspiegelt.

1.7 Hypothesengenerierung mittels Genexpressionanalyse

Um zu Beginn unserer Suche nach reagiblen Markern langfristiger Anpassung eine Vorselektion zu treffen, wurde in Studienteil I der BAM-Studie („Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport“) nicht Teil dieser Dissertation) Untersuchungen mittels Genchips/Microarrays durchgeführt. Ziel dieser Phase war es durch Nutzung eines Hochdurchsatzverfahrens die Expressionsprofile in Bezug auf verschiedene Zielgruppen und Reizzustände zu vergleichen. Untersucht wurden Muskelbiopsien untrainierter, ausdauertrainierter und krafttrainierter Probanden, jeweils in Ruhe und nach erfolgter (Ausdauer-/ Kraft-) Akutbelastung. Die Akutbelastung erfolgte je nach Gruppenzuordnung auf dem Fahrradergometer bzw. im Krafraum. Hierdurch gewonnene Ergebnisse dienten zur Hypothesengenerierung und Ausarbeitung der weiter zu bearbeitenden Fragestellung. Konkret bedeutet dies eine Genexpressionanalyse der aus den gewonnenen Muskelproben isolierten mRNA nach erfolgter Aufarbeitung und Qualitätskontrolle. Diese erfolgte durch Verwendung von GeneChips® der Firma Affymetrix™. Im nächsten Schritt wurden ausgewählte Kandidatengene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) genauer hinsichtlich ihrer Expression untersucht.

Passend zur vorwiegend aeroben Energiegewinnung in einer ausdauertrainierten Muskulatur, fand sich hier eine erhöhte Expression von Genen, die in Verbindung mit Enzymen des aeroben Stoffwechsels stehen. Besonders deutlich waren die Unterschiede

unter anderem im Bereich der Transkripte, die für die zwei verschiedenen Isoformen der Laktatdehydrogenase (LDH-A und LDH-B) kodieren. Es zeigte sich eine vergleichsweise höhere Expression von LDH-B in der ausdauertrainierten Muskulatur zur untrainierten Muskulatur, LDH-A war hingegen in der untrainierten Muskulatur höher exprimiert. Die durchgeführte Akutbelastung hatte keinen relevanten Einfluss auf die Expression. In Bezug auf PGC-1 α war eine erhöhte Expression nach der Ausdauer-Akutbelastung darstellbar, ohne relevanten Einfluss des Trainingszustandes.

Durch die Ergebnisse dieser Vorstudie wurde die LDH als reagibles Zielgen identifiziert. Aufgrund der essenziellen Rolle der Laktathomöostase im Ausdauersport und der wichtigen Rolle der Laktatleistungsdiagnostik in der Trainingssteuerung, entschieden wir uns dies als Schwerpunkt unserer weiteren Untersuchungen zu wählen.

1.8 Hypothese

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse stellten wir die Hypothese auf, dass durch Ausdauertraining auch beim Menschen, die Expression von PGC-1 α steigt und somit LDH-B erhöht und LDH-A verringert. Diese Veränderungen wären demzufolge durch Krafttraining nicht auslösbar. Im Folgeschluss müsste sich die LDH-A/LDH-B-Ratio verringern. Diese erniedrigte LDH-A/LDH-B-Ratio wäre möglicherweise als reagibler Marker für eine ausdauertrainierte Muskulatur und einen damit verbundenen optimierten Laktatstoffwechsel zu werten.

Um diesen Sachverhalt genauer zu beleuchten, verglichen wir in einem Vorversuch (nicht Teil dieser Dissertation), zunächst die mRNA-Expression von LDH-A und LDH-B im Muskel trainierter und untrainierter Probanden in Ruhe und nach akuter Kraft- bzw. Ausdauerbelastung. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob der Trainingsstatus einen Einfluss auf die Expression der Gene nach akuter Belastung hat. Im weiteren Verlauf wurden untrainierte Probanden in einer Cross-Over-Studie einem jeweils 8-wöchigen Ausdauer- und Krafttraining unterzogen, um den Einfluss verschiedener Trainingsformen auf die Genexpression zu vergleichen.

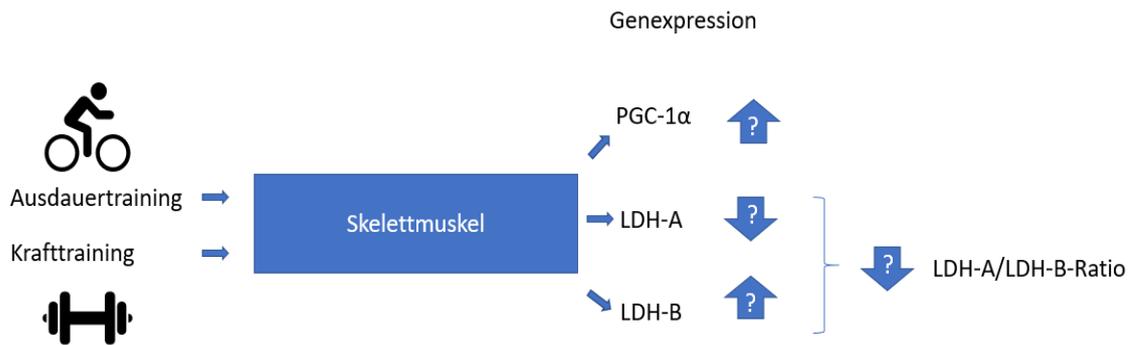


Abbildung 3: Schematische Darstellung der aufgestellten Hypothese

Ausdauertraining oder Krafttraining wirken als Reize auf den Skelettmuskel ein und führen dort auf Ebene der Genexpression zu Veränderungen bei PGC-1 α , LDH-A und LDH-B, dies resultiert in einer Veränderung der LDH-A/LDH-B-Ratio

PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; LDH-A = Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B

1.9 Fragestellungen

Aus diesen Überlegungen ergeben sich für meine Arbeit folgende Fragestellungen:

- Wie beeinflusst Ausdauertraining bzw. Krafttraining die LDH-A/LDH-B-Ratio im Muskel?
- Unterscheiden sich die durch Ausdauertraining bewirkten Veränderungen, von denen die durch Krafttraining erreicht werden?
- Kann die LDH-A/LDH-B-Ratio als Marker für die Ausdauerleistungsfähigkeit gesehen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Studiendesign

Die für unsere Untersuchungen genutzten Proben wurden im Rahmen einer multizentrisch angelegten Studie zur Optimierung von Training und Wettkampf: „Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport“ kurz BAM-Studie gewonnen.

Hierbei handelte es sich um ein vom Bundesinstitut für Sportwissenschaft (BISp) gefördertes Projekt (FKZ 2509BI1902, AZ 081902/09-13) der Universitätskliniken Gießen, Tübingen und Ulm. Ziel der Studie war die Entwicklung eines Matrixsystems, das die Optimierung des Trainingsmonitorings erlaubt und somit eine Optimierung der individuellen Trainings- und Anpassungsprozesse ermöglicht. Auf ein standardisiertes Ausdauer- oder Krafttraining reagiert jedes Individuum sehr unterschiedlich. So kommt es bislang zu einer breiten Streuung der Anpassungsreaktionen und damit verbundenen Heterogenität im Wirkungsgrad eines standardisierten Trainingsreizes. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten die Einflüsse bestimmter Belastungsformen auf zellulärer, molekularer, mechanischer und psychologischer Ebene untersucht werden.



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Studienabschnitte der BAM-Studie (Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport)

Studienteil I: Querschnittsstudie der Genexpression mittels Hochdurchsatzverfahren zur Korrelation unterschiedlicher Trainingszuständen und Einfluss einer akuten Belastung

Studienteil II: Cross-over-Studie zur Untersuchung der Anpassungsreaktion untrainierter Probanden auf ein Ausdauer- bzw. Krafttrainingsprogramm

Studienteil III: Karrierestudie zur Beobachtung individueller Entwicklung bei Nachwuchssportlern

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse basieren auf Studienteil II sowie den Ergebnissen aus Studienteil I als Grundlage zur Formulierung der Fragestellung.

Die Studie gliedert sich in folgende drei Studienteile (siehe **Abbildung 4**).

Studienteil I: Anhand einer Querschnittsstudie wurden unter Verwendung von Hochdurchsatzverfahren die Genexpressionsmuster der Skelettmuskulatur von Probanden unterschiedlicher Trainingszuständen in Ruhe und ihre Reaktion auf eine akute Belastung verglichen.

Studienteil II: In einer Cross-over-Studie nahmen untrainierte Probanden an einem standardisierten Ausdauer- und Krafttrainingsprogramm teil. Untersucht wurden die durch das Training hervorgerufenen Anpassungsreaktionen.

Studienteil III: Nachwuchssportler sollen im Rahmen einer Karrierestudie hinsichtlich ihrer individuellen Entwicklung und damit verbundenen Parametern beobachtet werden. Die Hauptaufmerksamkeit dieser Dissertation liegt hierbei auf Studienteil II sowie den Ergebnissen aus Studienteil I als Grundlage der zu vertiefenden Fragestellung.

Insgesamt standen die Daten von 72 Probanden aus Studienteil I und 21 Probanden aus Studienteil II zur Verfügung.

2.1.1.1 Probanden

Alle Probanden, die am ersten oder zweiten Studienteil teilnahmen, wurden vor Beginn über Ziele, Ablauf und Risiken der geplanten Untersuchungen aufgeklärt. Dies erfolgte in mündlicher und schriftlicher Form. Die Teilnahme erfolgte freiwillig.

Vor Beginn des jeweiligen Studienabschnittes wurden diese durch die Ethikkommission der Universität Ulm geprüft und mit zustimmender Stellungnahme abgeschlossen (Antrag Nr. 267/11).

Im ersten Teil der Studie wurden die Probanden anhand der in **Tabelle 1** aufgeführten Kriterien in 3 Gruppen unterteilt und hinsichtlich ihrer Reaktion auf eine akute Belastung untersucht. Es erfolgte die Unterteilung in Ausdauersportler, Kraftsportler und untrainierte Probanden.

Die Probanden aller 3 Gruppen erfüllten folgende Kriterien: männlich, 18-30 Jahre, Body-Mass-Index (BMI) 18,5 – 28,5 kg/m², Nichtraucher, keine chronischen Erkrankungen. 72 Probanden erfüllten diese Kriterien und wurden in Studienteil I eingeschlossen. Nach Zuordnung anhand der gruppenspezifischen Kriterien ergab sich folgende Verteilung: Ausdauersportler 20, Kraftsportler 18, untrainierte Probanden 34 von denen randomisiert 18 der Ausdauergruppe und 16 der Kraftgruppe zugeteilt wurden.

Tabelle 1: Einschlusskriterien der jeweiligen Gruppen Studienteil I der BAM-Studie (Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport) h= Stunden; KG= Körpergewicht; VO₂max= maximale Sauerstoffaufnahme; ORM= one repetition maximum

	Ausdauersportler	Kraftsportler	Untrainierte Probanden
<u>Sportanamnese:</u>			
Ausdauertraining	> 5h/ Woche	< 1h/ Woche	< 2h Freizeitsport/ Woche
Krafttraining	< 1h/ Woche	> 2x 1,5h /Woche	
<u>VO₂max:</u>	> 57 (ml/min/kg KG)	Beliebig	< 47 (ml/min/kg KG)
<u>ORM:</u>			
Bankzug	< 1x KG	> 1x KG	< 1x KG
Beinpresse	< 3,5x KG	> 3,5x KG	< 2,5x KG
Bankdrücken	< 1x KG	> 1x KG	< 1,5x KG
Eingeschlossene Teilnehmer	20	18	34

Der Fokus dieser Arbeit lag auf Studienteil II. Hier untersuchten wir ausschließlich Probanden, die in letzter Zeit nicht oder wenig sportlich aktiv waren. Alle in den zweiten Studienteil aufgenommenen Probanden erfüllten folgende Kriterien:

- maximal 2 Stunden Freizeitsport in der Trainingsanamnese
- keine akuten oder chronischen Erkrankungen
- keine medikamentöse Behandlung
- keine Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln
- Nichtraucher
- Alter zu Studienbeginn zwischen 18 und 40 Jahren
- BMI unter 30kg/ m²
- Ausdauerleistungsfähigkeit: maximale Sauerstoffaufnahme in der Fahrradspiroergometrie zwischen 30 und 50 ml/min/kg KG (Körpergewicht)
- Maximalkraft (2 der 3 Kriterien müssen erfüllt werden): Einer-Wiederholungsmaximum (one repetition maximum, ORM) Beinpresse < 2,5-fachen des eigenen Körpergewichtes, ORM Bankdrücken < 1,0-fachen des eigenen Körpergewichtes, ORM Bankzug < 1,0-fachen des eigenen Körpergewichtes

Vor Einschluss in die Studie unterzog sich jeder potenzielle Proband einer Voruntersuchung. Diese bestand aus einer ausführlichen Anamnese zu Gesundheitszustand

und aktueller körperlicher Aktivität, gefolgt von einer körperlichen Untersuchung durch das ärztliche Personal des jeweiligen Standortes und einer Leistungsdiagnostik.

Durchgeführt wurden eine Fahrradspiroergometrie im Stufenprotokoll (Steigerung um 25 Watt alle 3 Minuten) inklusive Laktatdiagnostik. Zudem wurden die ORM für die Geräte Beinpresse, Bankdrücken, Bankzug und Knieextension ermittelt.

2.1.1.2 Akutbelastung

Jeder Akutbelastung ging eine Ruhephase von 72 Stunden voraus, in denen die Probanden keine Trainingseinheiten absolvierten und sich auch sonst körperlich schonen sollten. Am Morgen der Belastung erhielt jeder Proband ein standardisiertes Frühstück (eine Laugenbrezel). Wasser durfte sowohl vor, wie auch während und nach der Belastung nach Belieben getrunken werden. Eine Stunde nach Ende der Akutbelastung auf dem Fahrradergometer erhielt jeder Proband ein Käsebrötchen.

Am Anfang jedes Trainingsblockes erfolgte eine Akutbelastung im Krafraum und auf dem Fahrradergometer (siehe **Abbildung 5**). Die akute Kraftbelastung erfolgte mit einer Aufwärmserie bei 40% des ORM, gefolgt von 5 Serien à 8-12 Wiederholungen bei 80% des ORM an allen 4 Geräten (Bankzug, Knieextension rechts und links, Bankdrücken, Beinpresse). Ggf. war auch hier eine Gewichtsreduktion beim Nichterreichen von mindestens 8 Wiederholungen möglich (siehe auch 2.1.3). Die Ausdauerakutbelastung bestand aus einer 60-minütigen Belastung auf dem Fahrradergometer. Diese gliederte sich in eine 10-minütige Aufwärmphase entsprechend 60% des $VO_2\max$ in Watt, gefolgt von 80% des $VO_2\max$ in Watt über 50 Minuten.

2.1.1.3 Trainingsprotokoll

Nach Abschluss der Voruntersuchung, Erfüllung aller Einschlusskriterien und der ersten Akutbelastung, begannen die Probanden mit einem 8-wöchigen Training. Da es sich um eine Cross-over-Studie handelte, begann ein Teil der Probanden mit dem Ausdauertrainingsblock, der andere mit dem Krafttrainingsblock (siehe **Abbildung 5**). Die Verteilung der Probanden auf die Gruppen erfolgte randomisiert.

Im Ausdauerblock wurde dreimal die Woche für jeweils 60 Minuten auf dem Fahrradergometer trainiert. Nach einer 10-minütigen Aufwärmphase bei 40% der

individuellen Maximalleistung wurde der Widerstand für die verbleibenden 50 Minuten auf 60% erhöht. Diese Intensität wurde für die 1. und 2. Trainingswoche beibehalten. Im weiteren Verlauf wurde die Intensität alle 2 Wochen um 5% gesteigert. Somit trainierten die Probanden am Ende der achtwöchigen Trainingsphase mit dem Widerstand, der bei der Eingangsuntersuchung dem Widerstand 75% ihrer maximalen Sauerstoffaufnahme entsprachen hatte.

Über die gesamte Trainingsphase wurde jedes Training unter Aufsicht absolviert. Dabei wurden Herzfrequenz sowie die subjektive Anstrengung mittels Borg-Skala zu festen Zeitpunkten dokumentiert. Außer dem Ruhewert vor Beginn des Trainings wurden nach Start der Belastung folgende Werte dokumentiert:

- nach 10 min (Ende der Aufwärmphase)
- nach 30min, 35min, 50min und 60min (Ende der Belastung)

Einmal wöchentlich wurden zudem vor Beginn des Trainings und direkt nach Ende der absolvierten Trainingseinheit kapilläre Blutproben zur Laktatdiagnostik gewonnen.

Auf die 1. Trainingsphase folgte eine 12 Wochen lange Detrainingsphase.

Der Krafttrainingsblock beinhaltete 32 Einheiten eines Krafttrainings über 8 Wochen.

Hierbei wurden bei jeder Trainingseinheit Übungen an 4 verschiedenen Geräten absolviert:

Bankzug, Knieextension rechts und links, Bankdrücken, Beinpresse. An jedem Gerät

wurden nach einem Warm-up mit 40% des jeweiligen ORM fünf Serien à 8-12

Wiederholungen bei 80% des ORM des Probanden absolviert. Für einen Satz (Übung

inklusive Pause) standen den Probanden 4 Minuten zur Verfügung. Nach Ablauf der 4

Minuten musste mit dem nächsten Satz begonnen werden. Zwischen den verschiedenen

Geräten hatten die Probanden zusätzlich 5 Minuten Zeit, um das Gerät zu wechseln. Für

den Fall, dass bei einem Gerät weniger als 8 Wiederholungen mit dem vorgegebenen

Gewicht erreicht wurden, war bei dem folgenden Satz eine Gewichtsreduktion um jeweils

5% des Ausgangswertes möglich. Kam es im Verlauf der Trainingsphase subjektiv zu einer

Unterbelastung des Probanden, wurde die Belastung sukzessive gesteigert. Auch in diesem

Trainingsblock wurde jedes Training unter Aufsicht absolviert. Die Herzfrequenz sowie die

subjektive Anstrengung mittels Borg-Skala zu festen Zeitpunkten wurden dokumentiert.

Einmal wöchentlich wurden zusätzlich kapilläre Blutproben zur Laktatdiagnostik

gewonnen. Diese Messdaten wurden jeweils vor Beginn des Trainings am entsprechenden

Trainingsgerät und nach Beendigung der letzten Serie am jeweiligen Trainingsgerät erfasst.

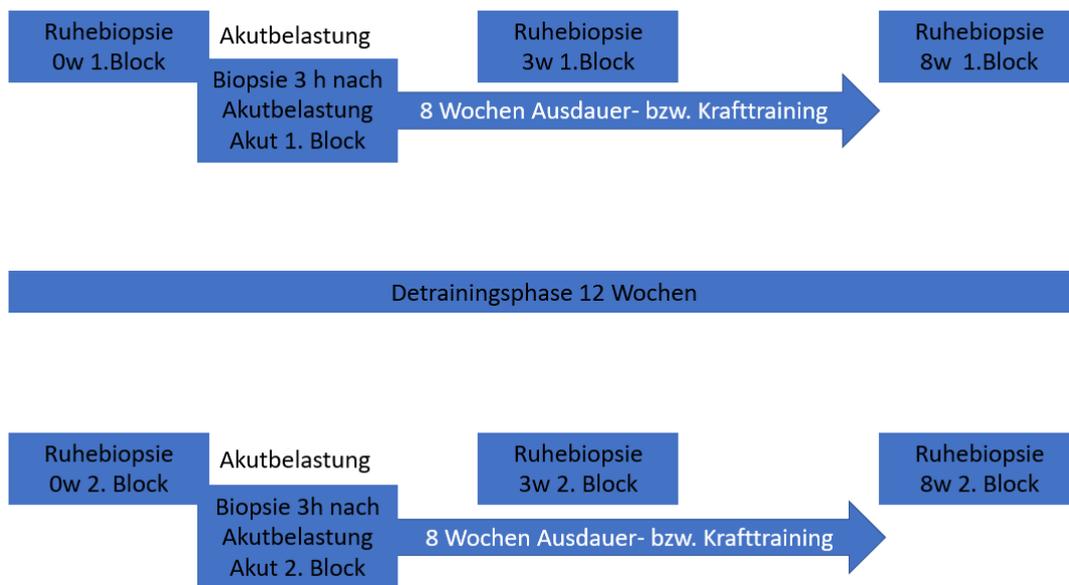


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zeitpunkte der Muskelbiopsieentnahmen im Studienteil II der BAM-Studie (Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport)

Entnahme von insgesamt 8 Biopsien pro Proband im Studienverlauf zu folgenden Biopsiezeitpunkten:

Vor Beginn des 1. Trainingsblocks: Ruhebiopsie 0w 1. Block

3h nach Ende der Akutbelastung (Krafttraum plus Fahrradergometer): Akut 1. Block

nach 3 Wochen Training der randomisiert zugeordneten Trainingsmodalität (Ausdauer bzw. Krafttraining): 3w 1. Block

nach 8 Wochen Training der randomisiert zugeordneten Trainingsmodalität (Ausdauer bzw. Krafttraining): 8w 1. Block

Entnahme der Muskelbiopsien im 2. Trainingsblock entsprechend dem 1. Trainingsblock

2.1.2 Muskelbiopsien

Die Entnahme der für unsere Untersuchungen notwendigen Muskelproben erfolgte nach ausführlicher Aufklärung der Probanden über Vorgehensweise, Nutzen und Risiken. Alle Probanden willigten freiwillig in die Entnahme ein. Die Entnahme erfolgte ausschließlich durch qualifiziertes und im Studienprotokoll autorisiertes ärztliches Personal der 3 Studienstandorte.

Zunächst wurde die geplante Entnahmestelle im lateralen Bereich des Musculus quadriceps femoris sonographisch untersucht, um die Lage der in diesem Bereich verlaufenden Blutgefäße und Fettgewebe zu kennen. So konnte sicher gestellt werden, dass diese bei der Entnahme nicht beschädigt bzw. Fettgewebe anstelle des gewünschten Muskelgewebes entnommen wurde.

Nach gründlicher Desinfektion der Injektionsstelle erfolgte eine lokale Betäubung der Haut im entsprechenden Bereich mit Lokalanästhetika (1%-iges Mepivacain). Bei bestehender Schmerzfreiheit des Probanden wurden im Anschluss 5 Feinnadel-Muskelbiopsien (Plus Speed; Peter Pflugbeil GmbH, Zorneding, Deutschland) aus dem Vastus lateralis des

Musculus quadrizeps femoris entnommen. Die gewonnenen Gewebestücke wurden unmittelbar nach den Entnahmen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die Entnahmestelle wurde nach Abschluss der Probenentnahme für 5-10 Minuten manuell komprimiert und anschließend mit einem sterilen Druckverband versorgt.

Im Studienteil I wurden Muskelbiopsien in Ruhe (Tag vor der Akutbelastung), 30 Minuten nach Ende der Akutbelastung, sowie 3 Stunden nach Ende der Akutbelastung entnommen. Muskelbiopsien in Studienteil II wurden jeweils vor dem Trainingsblock in Ruhe (Ruhebiopsie vor 1. bzw. 2. Block), 3 Stunden nach der Akutbelastung vor Beginn des Trainingsblockes (nach Akutbelastung vor 1. bzw. 2. Block), in Ruhe nach 3 Wochen Training (Ruhebiopsie 3w 1. bzw. 2. Block) und in Ruhe nach 8 Wochen Training sprich am Ende des Trainingsblockes (Ruhebiopsie 8w 1. bzw. 2. Block) entnommen. Somit standen in Studienteil I Biopsien von 3 Zeitpunkten und in Studienteil II Biopsien von 8 Zeitpunkten pro Proband zur Analyse zur Verfügung.

Ergänzend zu den oben genannten Muskelbiopsien wurde am Standort Ulm eine weitere Muskelbiopsie 3 Stunden nach der jeweiligen Akutbelastung am Ende der beiden Trainingsblöcke entnommen.

2.1.3 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Zur weiteren Analyse erfolgte zunächst die Aufarbeitung der gewonnenen Muskelproben. Hierfür wurden die Muskelproben in RIPA-Puffer (150mMol NaCl, 25mMol Tris HCL, 0,1% SDS, 1% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), NP-40, 1% sodium deoxycholate, ddH₂O) mit eine Tablette cOmplete™, einem Mini Protease Inhibitor Cocktail der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), gegebene. In dieser Lösung wurden sie anschließend mit Hilfe des TissueRuptor von Qiagen (Venlo, Niederlande) zerkleinert und homogenisiert. Genaueres Vorgehen siehe TissueRuptor Handbook. Vorteil dieser Vorgehensweise ist die Benutzung eines neuen disposable Probes für jede Probe. Hierdurch wird das Risiko einer Kreuzkontamination minimiert.

Zur Gewinnung der RNA wurden die Proben anschließend über RNeasy Mini Kit Säulen (RNeasy Fibrous Tissue Mini kit, Qiagen, Venlo, Niederlande) aufgereinigt. Vorgehen entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Durch den Zusatz von Proteinase K werden im Gewebeblock enthaltene Proteine entfernt, DNA durch DNase I. Die anschließende Bindung der RNA an eine spezielle Membran, ermöglichte es, nicht erwünschte

Bestandteile auszuwaschen, ohne RNA zu verlieren. Auf diese Weise erhält man möglichst große Mengen einer möglichst reinen mRNA. Diese in den Proben enthaltene mRNA wurde, nach Bestimmung der Konzentration, auf die einheitliche Konzentration von 0,5ng/µl gebracht. Hierfür wurde das Vollspektrum-UV-Vis-Spektralphotometer NanoDrop 2000/ 2000c (Thermo Scientific™, Rockford, USA) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die RNA mithilfe des Qiagen Quanti-Tect Reverse Transcription Kit (#205311), welches das Enzym Reverse Transkriptase enthält, revers in Erststrang cDNA transkribiert. Durchführung der cDNA Synthese anhand der im Kit enthaltenen Anleitung. Für die weitere Analyse wurden die Proben nach Abschluss der Transkription auf Grundlage der zuvor mittels NanoDrop gemessenen RNA-Konzentration auf eine einheitliche cDNA-Konzentration von 0,5ng/µl gebracht. Die Proben waren dann bereit zur weiteren Analyse.

Die Quantitative Real-time PCR (qPCR) zur Genexpressionsanalyse wurde mit einem Light Cycler 480 der Firma Roche durchgeführt. Zuvor wurden die Primereffizienzen der verwendeten kommerziellen Primer von Qiagen über eine cDNA-Verdünnungsreihe aus einer früheren PCR desselben Primers ermittelt. Alle PCR-Konditionen wie Dauer, Temperatur sowie Anzahl der Zyklen richteten sich nach dem Herstellerprotokoll von QIAGEN (QuantiNova SYBR Green PCR Kit). So gewonnene Ergebnisse wurden mittels der Delta-Delta-C(t) Methode von Livak und Schmittgen 2001 ausgewertet. Diese Methode ermöglicht, die Genexpression als x-fachen Wert in Bezug auf ein Referenzgen, in unserem Falle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), anzugeben. Bei GAPDH handelt sich um ein Housekeeping-Gen, welches durch akute sportliche Ausdauerbelastung nicht in seiner Expression beeinflusst wird, also konstitutiv exprimiert wird (Mahoney et al. 2004). Auch durch eine akute Kraftbelastung verändert sich die Expression nur geringfügig (Mahoney et al. 2004). GAPDH eignet sich somit als Referenzgen in unseren Untersuchungen, da Training nur einen zu vernachlässigenden Einfluss auf seine Expression hat. Von jeder PCR-Probe wurden Triplets angefertigt, um mögliche Messfehler zu minimieren.

Verwendete Primer und ihre Effizienzen in %

GAPDH (#QT00079247) 99,3%
PGC1a (#QT00095578) 100,3%
LDHA (#QT00001687) 101,3%
LDHB (#QT00071512) 101,5%

$\Delta\Delta\text{Ct}$ Quantification of real-time PCR results

$\Delta\text{Ct}(\text{treatment sample}) = \text{Ct}(\text{target gene}) - \text{Ct}(\text{housekeeping gene})$

$\Delta\text{Ct}(\text{control sample}) = \text{Ct}(\text{target gene}) - \text{Ct}(\text{housekeeping gene})$

$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{treatment sample}) - \Delta\text{Ct}(\text{control sample})$

Fold induction (RQ): $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$

rescaling RQ = RQZielgen/ Mittelwert RQKontrolle

Zum Spezifitätsnachweis der gewonnenen Produkte wurden Schmelzkurvenanalysen, sowie eine Auftrennung mittels Gelelektrophorese durchgeführt.

2.1.4 Western Blot

Zur Korrelation der mittels PCR gewonnen Ergebnisse über Veränderungen auf Genebene, mit den Veränderungen auf Proteinebene, führten wir einen Western Blot durch.

2.1.4.1 Herstellung SDS-Gel (Natriumdodecylsulfat-Gel)

Unsere Zielproteine LDH-A und LDH-B besitzen eine Größe von 35 bzw. 37 kDa (Kilodalton). Um Proteine dieser Größe effizient auftrennen zu können, eignet sich ein Trenngel mit 15% Acrylamid. Dies ist geeignet für Proteine einer Größe von 12-45 kDa. Bei einer angestrebten Gelstärke von 1 mm und 10 Taschen pro Gel, konnte jede Tasche mit maximal 30 μl befüllt werden. Pro Gel wurden 5,6 ml des Trenngels benötigt. Zur Herstellung von 2 Gelen wurden 4,8 ml destilliertes deionisiertes Wasser, 10ml 30% Acrylamid/ Bis, 5,0 ml Gelpuffer (1,5 M Tris-HCL, pH 8,8) und 0,2ml 10% w/v SDS (Natriumdodecylsulfat) gemischt. Die zuvor mit Wasser und Isopropanol gereinigten Glasplatten, wurden mittels Spacer plate so im Casting frame positioniert, dass sie in einem Abstand von 1 mm voneinander standen. Hierdurch wurde die Dicke des Gels auf 1 mm festgelegt. Aus der Geldicke und dem verwendeten Probenkamm resultierte die spätere Ladekapazität pro Geltasche. Bei einer Geldicke von 1mm und einem Probenkamm mit 10 Taschen betrug das Ladevolumen pro Tasche maximal 30 μl . Um auch den Zwischenraum an der unteren Kante der beiden Glasplatten abzudichten und so ein Auslaufen zu verhindern, erfolgte die Positionierung in einem Casting stand. Die verwendete Apparatur ermöglichte das simultane Gießen von 2 Gelen. Wenn alle Vorbereitungen abgeschlossen waren, wurden dem Gemisch 0,1 ml APS (Ammoniumpersulfat) und 0,01ml TEMED (Tetramethylethyldiamin) hinzugefügt. Diese 2 Chemikalien führten zur Polymerisation der Gelbestandteile. Durch kurzes Schwenken des Becherglases wurde sichergestellt, dass

sich die Bestandteile gleichmäßig vermischten. Pro Gel wurden nun 5,6 ml zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Um eine ebene, blasenfreie Kante zu erhalten wurde wassergesättigtes Isopropanol auf die Oberkante pipettiert. Dies bewirkte zusätzlich eine Abdichtung und verhinderte, dass Sauerstoff in das Gel eindringen konnte. Nach einer Ruhezeit von 45 Minuten, in der sich die Polymere ausgebildet hatten, wurde der Alkohol abgeschüttet. Es musste dabei unbedingt verhindert werden, dass sich das Isopropanol länger als eine Stunde auf dem Trenngel befand. Hierdurch hätte es zu einer Dehydratation der obersten Gelschichten kommen könne. Bevor das Sammelgel auf das Trenngel gegossen wurde, erfolgte eine Spülung der Oberkante des Trenngels mit destilliertem Wasser. Eventuell verbleibende Wassertropfen wurden vorsichtig mit Whatman paper entfernt, ohne dabei das Gel zu berühren. Für das Sammelgel wurden 6,1ml destilliertes deionisiertes Wasser, 1,3ml 30% Acrylamid/ Bis, 2,5ml Gelpuffer (0,5 M Tris-HCL, pH 6,8) und 0,1ml 10% w/v SDS gemischt. Kurz vor dem Gießen des Gels wurden 0,05 ml APS und 0,01ml TEMED hinzugefügt. Das somit entstandene 4%ige Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen. Ein Probenkamm mit zehn Kammern wurde eingesetzt. Nach einer Ruhephase von 30-45 Minuten, in der die Polymerisation erfolgte, wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Kante gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Das Gel war nun zur Beladung bereit.

Tabelle 2: Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel

Trenngel 15% Acrylamid	destilliertes deionisiertes Wasser	4,8ml
	30% Acrylamid/ Bis	10,0ml
	Gelpuffer (1,5 M Tris-HCL, pH 8,8)	5,0ml
	10% w/v SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,2ml
	APS (Ammoniumpersulfat)	0,1ml
	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	0,01ml
Sammelgel 4% Acrylamid	destilliertes deionisiertes Wasser	6,1ml
	30% Acrylamid/ Bis	1,3ml
	Gelpuffer (0,5 M Tris-HCL, pH 6,8)	2,5ml
	10% w/v SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,1ml
	APS (Ammoniumpersulfat)	0,05ml
	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	0,01ml

2.1.4.2 Protein Quantifikation

Als Vorbereitung auf die spätere Analyse der relativen Veränderungen im jeweiligen Protein, war es notwendig die Proteinkonzentration jeder Probe zu kennen, um die Taschen des Gels mit der korrekten Menge Protein befüllen zu können. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in unseren Proben wurden die gefrorenen Muskelproben zunächst wie unter Punkt 2.1.3 beschrieben mit dem TissueRuptor von Qiagen zerkleinert und

homogenisiert. Dies erfolgte gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung von RIPA-Puffer und Protease Inhibitor. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation der Tubes bei 4°C. Der Überstand, welcher die Proteine enthielt, wurde abgenommen. Das sich darunter befindende Pellet aus den übrigen Zellbestandteilen wurde verworfen.

Zur Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible (Thermo Scientific, Rockford, USA) Nummer 23250 verwendet. Es basiert auf der durch Proteine in alkalischer Lösung verursachten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ . Diese wiederum bilden mit BCA (Bicinchoninsäure, bicinchoninic acid) einen violetten Komplex, der bei 562nm photometrisch detektiert werden kann. Die Verwendung dieses speziellen Kits bot den Vorteil, dass es zu keiner Beeinträchtigung der Messung durch Reagenzien kam, die zur Reduktion von Disulfidbrücken führen. Zuerst wurde einer Standardkurve einer Verdünnungsreihe (2.000-125 $\mu\text{g/ml}$) unter der Verwendung von BSA (Rinderalbumin, bovine serum albumin) erstellt. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde hierbei der gleiche Sample-Puffer wie bei unseren Proben verwendet. Zu jeweils 25 μl Probe (BSA Verdünnungsreihe bzw. zu bestimmende Proteinprobe 1:10 mit Sample-Puffer plus Proteaseinhibitor) wurden 25 μl Compatibility Reagent Stock hinzugefügt. Nach kurzem vortexen wurden die Tubes 15 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach Hinzugeben von jeweils 1ml BCA Working Reagent (50:1 BCA Reagent A:B) erneute Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 30 Minuten. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden diese innerhalb von 10 Minuten im Spektrophotometer bei 562nm gemessen. Hierdurch wurde die durch das enthaltene Protein reduzierten Kupferionen, die anschließend mit BCA einen violetten Komplex bildeten, quantifiziert und somit ein Rückschluss auf die enthaltene Proteinmenge möglich. Anhand der so erhaltenen Werte für die BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt. Diese ermöglichte den bei unseren Proben gemessene Werten die entsprechende Proteinkonzentration zuzuordnen. Genaue Vorgehensweise siehe Beschreibung des Herstellers.

2.1.4.3 Gelelektrophorese

Als ersten Schritt erfolgte die Auftrennung der Proteine durch das bewährte Prinzip der Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel mit SDS. Durch Hinzugabe des anionischen

SDS wird die natürliche Ladung der Proteine überlagert. Sie wandern damit entsprechend ihrer Größe und können so zuverlässig geordnet werden (Weber und Osborn 1969).

Für den 10x Laufpuffer wurden 30,3g Tris base, 144,0g Glycerin und 10,0g SDS in deionisiertem Wasser gelöst und auf ein Volumen von 1000ml verdünnt. Diese Stocksolution konnte vorbereitet und bei 4°C gelagert werden. 80ml dieses 10x Laufpuffers wurden mit 720ml Wasser verdünnt, sodass ein Verhältnis von 1:10 erreicht wurde. Die Elektrophoreseapparatur (Mini PROTEAN® Tetra Cell, BIO-RAD, Hercules, California, USA) wurde aufgebaut, zwei der zuvor hergestellten Gele mittels clamping frame befestigt und der Behälter mit dem zuvor im Verhältnis 1:10 verdünnten Laufpuffer befüllt. Um jede Geltasche mit einer einheitlichen Proteinmenge von 5µg, der jeweiligen Probe, bestücken zu können, wurden die Proteinlysate verdünnt. Hierzu wurde die 5µg Protein enthaltende Menge des Proteinlysates mit Lysisbuffer (RIPA) auf 25µl aufgefüllt. Vor dem Befüllen der Geltaschen mit den zu analysierenden Proteinen wurden den Proteinproben Ladepuffer zugefügt. Der hierzu bereits vorbereitete 6x SDS Ladepuffer bestand aus 375mM Tris-HCl, Glycerol 50% (w/v), SDS 9% (w/v) und Bromphenolblau 0,03% (w/v), ergänzt mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50ml. Nachdem der 6x SDS Ladepuffer für circa 90 Minuten (bis sich das SDS gelöst hatte) auf der Heizplatte gerührt wurde, konnte er bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden. Vor Benutzung wurden diesem 6x SDS Ladepuffer 50µl β-Mercaptoethanol je 950 µl zugesetzt. Zu jeder Proteinprobe wurden 5µl des 6x SDS Ladepuffers hinzugegeben. Anschließend wurde sie für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Die Geltaschen konnten nun mit den einheitlich konzentrierten Proteinproben (27µl pro Tasche) oder den Leitermarkern (5,5µl pro Tasche) bestückt werden. Je Gel wurden die Taschen 1 und 10 mit Leitermarkern bestückt. Die Taschen 2 bis 9 enthielten die sieben Proteinlysate eines Probanden von unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten. Tasche 6 enthielt keine Probe und wurde mit Puffer bestückt. Je Proband wurden zwei Gels mit identischer Probenbestückung gefahren, um anschließend im Western Blot die Inkubation mit jeweils einem Antikörper gegen LDH-A und LDH-B zu ermöglichen. Aufgrund der ähnlichen Molekülgrößen der LDH-A und LDH-B Proteine wäre dies nicht auf einem Gel möglich gewesen. Anschließend konnte die Spannung angelegt und die Elektrophorese begonnen werden. Bis die Proben das Laufgel erreicht hatten (ca. 30 min), verwendeten wir eine Spannung von 80 Volt. Anschließend erhöhten wir sie auf 150 Volt bis die führende blaue Proteinfront das Gel fast verließ. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Elektrophorese, nach einer gesamten Laufzeit von ungefähr 4 Stunden, beendet.

2.1.4.4 Transfer

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine von dem SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen. Der Transfer erfolgte mittels Elektrotransfer in einem Tank-Blot-System. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer für 3 Minuten in 100%igem Methanol inkubiert. Anschließend wurde sie 2-3 Minuten in Transferpuffer gelegt. Der Transferpuffer bestand aus 25mM Tris base, 192 mM Glycerin und 20% Methanol. Auf das zusätzliche Hinzufügen von SDS wurde aufgrund der geringen Proteingröße verzichtet. Nach blasenfreier Platzierung der Membran und des Gels zwischen 2 Filterpapieren und Foam Pads zu beiden Seiten, wurde der so erhaltene Sandwich, in der hierfür vorgesehenen Kassette, im Transfertank platziert. Dieser wurde zuvor etwa zur Hälfte mit Transferpuffer gefüllt. Nach Überprüfung der korrekten Positionierung und Orientierung (PVDF-Membran Richtung Anode) und Einbringen einer Cooling Unit, wurde Transferpuffer bis zur Fülllinie ergänzt und der Deckel des Systems aufgesetzt. Nun wurde der Transfer durch Anlegen der Spannung begonnen (140V für 90 min). Die negativ geladenen Proteine wanderten Richtung Anode und wurden so auf die PVDF-Membran übertragen. Um eine Überhitzung zu verhindern, wurde das System zusätzlich von außen durch Kühlakkus gekühlt.

2.1.4.5 Kontrolle des korrekten Proteintransfers mittels Ponceau S

Um den korrekten Proteintransfer vom Elektrophoresegel auf die PVDF-Membran zu kontrollieren, wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran mittels Ponceau S angefärbt. Ponceau S ermöglicht die reversible Anfärbung der Banden ohne Beeinträchtigung des weiteren Verfahrens. Die hierfür verwendete Ponceaulösung bestand aus 0,1% Ponceau S (w/v) in 5%iger Essigsäure. Die PVDF-Membranen wurden für 5 Minuten in der Lösung auf dem Schüttelbrett inkubiert. Anschließend wurden sie mehrfach in destilliertem deionisiertem Wasser gespült, bis der Hintergrund entfärbt war. Das Bandenmuster wurde fotodokumentiert (siehe **Abbildung 6**).

Zur weiteren Verarbeitung wurden die PVDF-Membranen dreimal für je circa 10 Minuten in TTBS (20 mMol Tris-HCl, 500 mMol NaCl, 0,1% Tween 20 (pH 7,5)) gewaschen, bis die Proteinbanden erneut entfärbt waren.

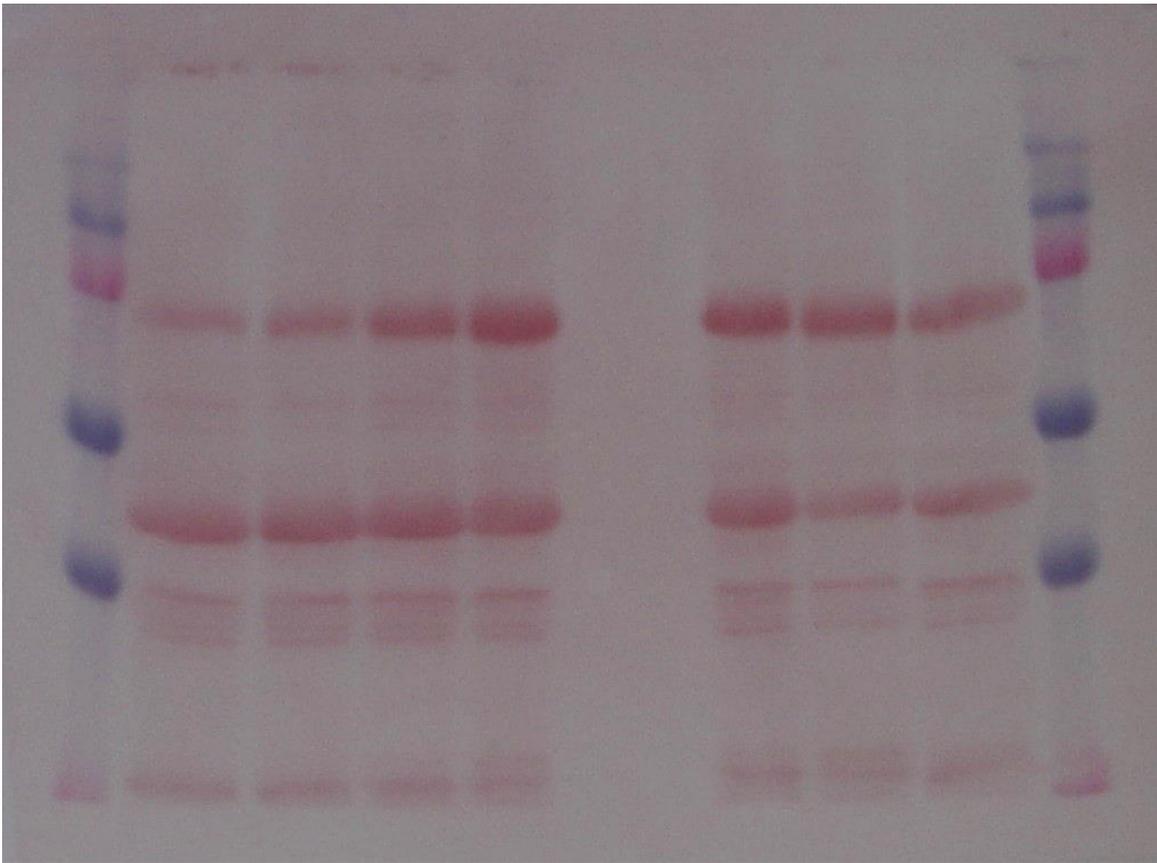


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der mittels Ponceau S angefärbten Proteinbanden auf der PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran

2.1.4.6 Blockierung freie Stellen der PVDF-Membran

Im nächsten Schritt wurden durch eine spezielle Lösung freie Stellen der PVDF-Membran blockiert. Hierfür wurde eine 5%ige Lösung aus fettfreiem Milchpulver und TBS (tris-buffered saline) hergestellt. Die in der Lösung enthaltenen Proteine blockierten die freien Stellen der Membran und verhinderten somit eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membranoberfläche. Aufgrund der hohen Spezifität der von uns verwendeten Antikörper wurden die im Milchpulver enthaltenen Proteine nicht gebunden und führten somit zur keiner Ergebnisverfälschung. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.1.4.7 Proteinnachweis durch spezifische Antikörper

Aufgrund der ähnlichen Molekülgröße der Proteine LDH-A und LDH-B sind zur sicheren Differenzierung und Abgrenzung hochselektive Antikörper notwendig. Diese dürfen über keine Kreuzreaktionen verfügen. Die hierzu bestellten Antikörper der Firma abcam® (Milton, England), zeigten im Vorversuch eine Kreuzreaktion. Der Antikörper gegen

LDH-B (ab85319) war selektiv für LDH-B und führte zu keiner Reaktion mit LDH-A. Der Antikörper gegen LDH-A (ab47010) hingegen ging sowohl mit LDH-A wie auch LDH-B eine Bindung ein und war somit nicht selektiv (siehe **Abbildung 7**). Da eine sichere und selektive Bindung für den Versuchsaufbau unverzichtbar war, konnte mit den vorliegenden Antikörpern nicht weitergearbeitet werden. Es mussten neue LDH-A-Antikörper bestellt werden. Hierfür wurden die LDH-A-Antikörper (sc27230) der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, USA) gewählt. Diese sollten laut Hersteller keine Bindung mit LDH-B eingehen. Dies bestätigte sich in den durchgeführten Vorversuchen.

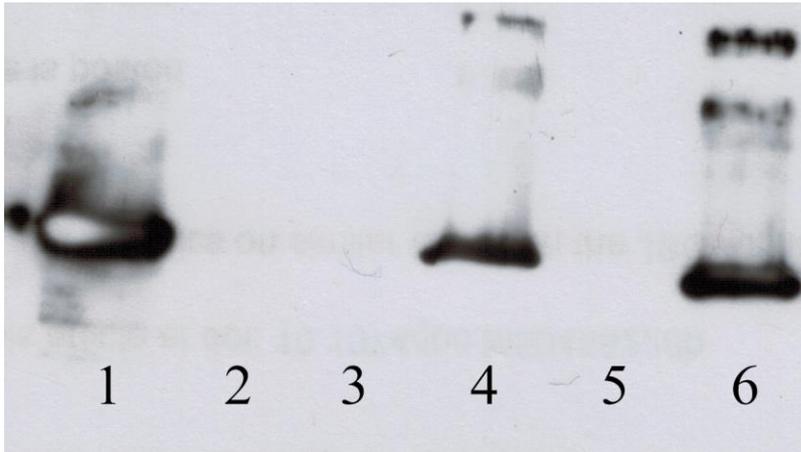


Abbildung 7: Western Blot zur Testung der Spezifität der erhaltenen Antikörper (AK) für LDH-A (abcam®, ab47010) und LDH-B (abcam®, ab85319); Kreuzreaktion des als spezifisch für LDH-A beschriebenen AK mit LDH-B

1-3 aufgetragenes **Protein LDH-A**

4-6 aufgetragenes **Protein LDH-B**

plus

1 Primärantikörper **LDH-A** plus anti rabbit Sekundärantikörper

2 ausschließlich anti rabbit Sekundärantikörper

3 Primärantikörper **LDH-B** plus anti mouse Sekundärantikörper

4 Primärantikörper **LDH-B** plus anti mouse Sekundärantikörper

5 Primärantikörper **LDH-B**

6 Primärantikörper **LDH-A** plus anti rabbit Sekundärantikörper

Zur Verdünnung der Antikörper wurde Antikörperpuffer (2% nonfat milk-TTBS) verwendet.

Vor Beginn der Inkubation wurden die PVDF-Membranen auf Höhe der 37kDa Marker horizontal geteilt. Somit war es möglich das gewählte Referenzprotein β -Actin und LDH-A bzw. LDH-B mit unterschiedlichen Antikörpern zu inkubieren. Die beiden proximalen Abschnitte mit Proteinen einer Molekülgröße > 37 kDa, inklusive β -Actin, wurden über Nacht mit dem primären Antikörper: Anti-Actin monoklonale Maus-Antikörper

CP01-1EA (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Verwendet wurde eine Verdünnung von 1:10 000 in Antikörperpuffer. Die distalen Abschnitte, welche die Proteine LDH-A und LDH-B enthielten, wurden entweder in LDH-A Antikörper (N-14), polyklonales IgG aus der Ziege (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA (sc27230)) oder Anti-Lactate Dehydrogenase B antibody [60H11] mouse monoclonal (abcam®, Milton, England (ab85319)) inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Morgen wurden die Membranabschnitte jeweils separat dreimal für je 12 Minuten in TTBS gewaschen um überschüssige, nicht gebundene Antikörper, zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur. Hierfür wurde der Goat Anti-Mouse IgM (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (401225)) in einer Verdünnung von 1:10 000 mit Antikörperpuffer für die zuvor in Anti-Aktin-Antikörper inkubierten Membranabschnitt verwendet. Zur Bindung an den Anti-LDH-A-Antikörper wurde die entsprechende Membran in donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA (sc2020)), bzw. goat anti-mouse IgG F(ab')₂, polyclonal antibody (HRP conjugate) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA (ADI-SAB-100-J)) für den Anti-LDH-B-Antikörper, jeweils in einer Verdünnung von 1: 5 000 mit Antikörperpuffer, inkubiert. Die sekundären Antikörper trugen jeweils das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase (HRP)), welches im nächsten Schritt als Katalysator fungierte.

Es folgte ein erneuter Waschzyklus.

2.1.4.8 Detektion der Proteinexpression mittels Chemilumineszenz

Die Proteinexpression in den verschiedenen Proben eines Probanden wurde mittels Chemilumineszenz detektiert und konnte so im weiteren Verlauf verglichen und ausgewertet werden. Hierfür nutzten wir die chemischen Eigenschaften der an die sekundären Antikörper gebundenen HRP. Mit Hilfe dieses Enzyms wird die Reaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid katalysiert und es entsteht Chemilumineszenz. Genaue Vorgehensweise: Die Membranabschnitte wurden so in der Filmkassette platziert, dass die Schnittstellen aneinandergrenzten und wieder eine komplette Membran in ihrer ursprünglichen Konfiguration entstand. Die beiden Membranen wurde nun für eine Minute in 2ml ECL (enhanced chemiluminescence) Western Blotting Detection Reagents Fa. Amersham GE Healthcare (Nr. RPN2106) (Verhältnis Detektion reagent 1 zu 2: 1:1) inkubiert. Überschüssiges ECL wurde anschließend entfernt.

Die folgenden Schritte fanden in einer Dunkelkammer statt. Ein Röntgenfilm wurde auf die Membran gelegt und bei geschlossener Kassette exponiert. Anschließend wurde der Film bis zum Erkennen eines Signals in Developer entwickelt. Anschließend für 30 Sekunden in Fixierlösung fixiert und zum Abschluss in Wasser gewaschen, um die Fixierlösung abzuwaschen. Die fertig entwickelten Filme wurden zum Trocknen aufgehängt.

Jede Membran wurde mit verschiedenen Expositionszeiten entwickelt (2sec, 10sec, 30sec, 60sec, 90sec, 120sec).

Die trockenen Filme wurden zum Abschluss auf die jeweilige Membran gelegt, um die Banden der Markerproteine zu markieren.

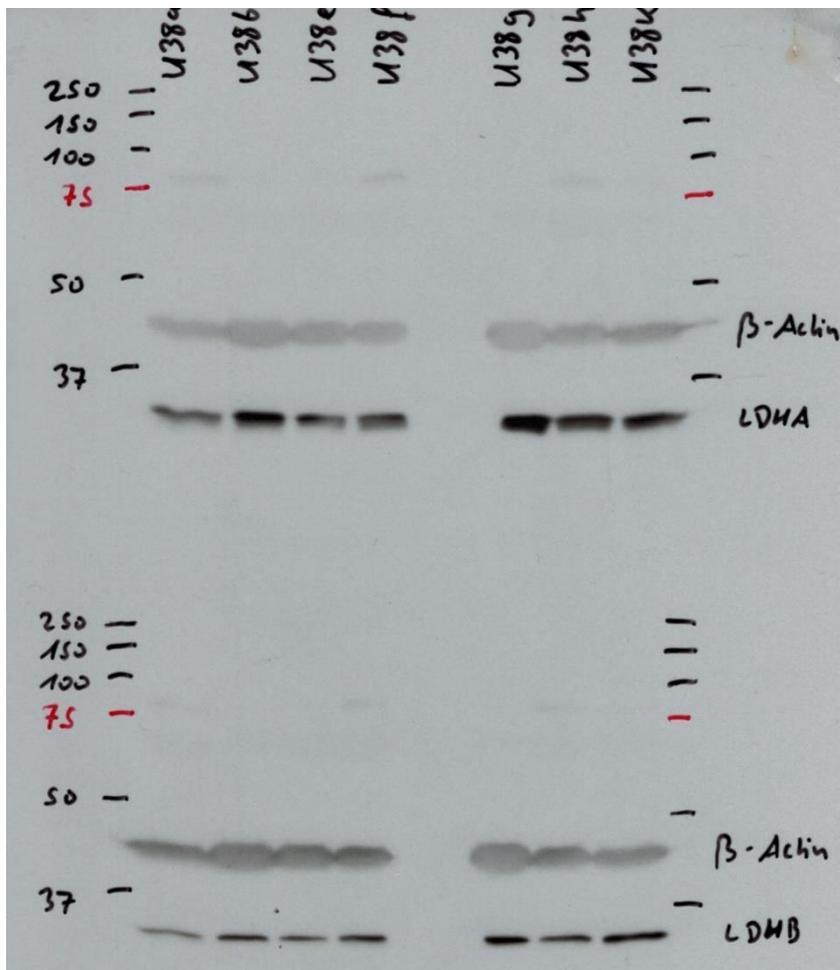


Abbildung 8: Eingesanntes Beispiel eines Röntgenfilmes mit Darstellung der Proteinbanden für β -Actin, LDHA (Laktatdehydrogenase A) und LDHB (Laktatdehydrogenase B) nach Abschluss des Western Blot mit den aus verschiedenen Muskelbiopsien eines Probanden gewonnen Proteinlysaten zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten

2.1.4.9 Auswertung

Die Auswertung der Röntgenfilme erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmes Image J. Hierfür wurden die Filme eingescannt und durch das Programm eine Kurve erstellt. Aufgrund der Korrelation zu der Fläche unter der Kurve mit der Bandenintensität, konnten somit Rückschlüsse auf die Menge des detektierten Proteins gezogen werden.

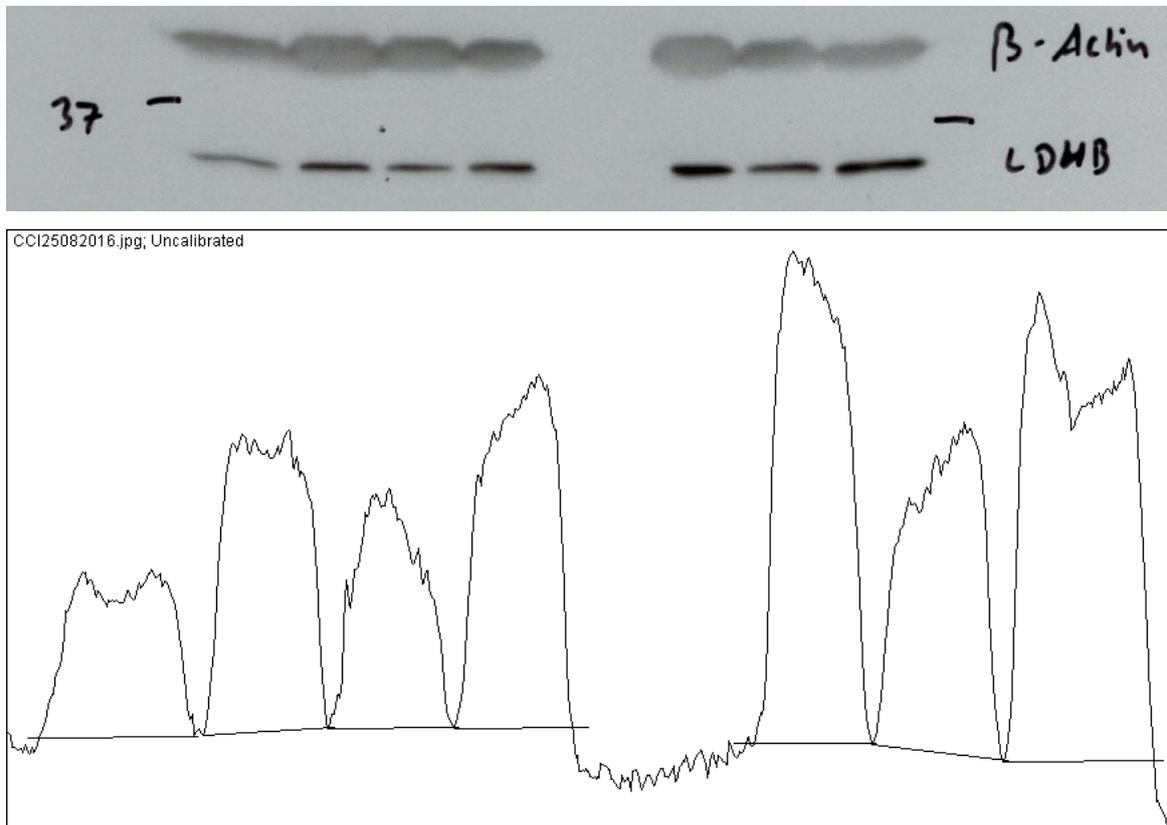


Abbildung 9: eingescanntes Bandenmuster der Proteinexpression von LDH-B (Laktatdehydrogenase B) und β -Actin auf Röntgenfilm, und des daraus durch Image J für die LDH-B Banden erstellte Kurve

2.1.5 Statistische Auswertung

Die statistische Aufarbeitung und Auswertung der aus den Muskelbiopsien mittels Analyse gewonnen Datensätze erfolgte mit der Software MedCalc (Mariakerke, Belgien). Da es sich um verbundene Stichproben ohne Normalverteilung mit großer interindividueller Variabilität handelt, wurde hierfür der Wilcoxon-Test verwendet. Der in ähnlichen Arbeiten meist verwendete t-Test wurde, aufgrund der Eigenschaften der Daten, als nicht adäquat angesehen. Aus diesem Grund werden der Median und der Interquartilsabstand als statistische Kenngrößen anstelle des Mittelwertes und der Standardabweichung angegeben. Mittels Wilcoxon-Test wurden Unterschiede bestimmt und bei $p < 0,05$ als signifikant gewertet. Dies wurde in den jeweiligen Schaubildern entsprechend gekennzeichnet.

2.2 Material

2.2.1 Leistungsdiagnostik und Trainingsstudie

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Hersteller</u>
Biosen S-Line	Laktatmessgerät	EKF-diagnostic GmbH, Barleben, Deutschland
Excalibur Sport Ergostik, Blue Cherry V1.2.1.27 ECGpro:4.21 Polar FT1	Ergometer Spriergometriegerät 6 Kanal EKG Pulsuhr	Lode B.V. Groningen, Niederlande Geratherm, Geschwenda, Deutschland AMEDTEC, Aue, Deutschland Polar Electro GmbH, Büttelborn, Deutschland
Plus Speed	Biopsienadel	Peter Pflugbeil GmbH, Zorneding, Deutschland)
1%-iges Mepivacain	Lokalanästhetikum Desinfektionsmittel Flüssiger Stickstoff	

2.2.2 Probenbearbeitung und Analyse im Labor

Polymerasekettenreaktion (PCR)

TissueRuptur RNeasy Mini Kit Qiagen Quanti-Tect Reverse Transcription Kit (#205311) Vollspektrum-UV-Vis-Spektral- hotometer NanoDrop 2000/ 2000c		Qiagen, Venlo, Niederland Qiagen, Venlo, Niederland Qiagen, Venlo, Niederland Thermo Scientific™, Rockford, USA
--	--	---

Gelelektrophorese und Western Blot

Trenngel 15% Acrylamid	destilliertes deionisiertes Wasser 30% Acrylamid/ Bis Gelpuffer (1,5 M Tris-HCL, pH 8,8) 10% w/v SDS (Natriumdodecylsulfat) APS (Ammoniumpersulfat) TEMED (Tetramethylethylendiamin)
-------------------------------	---

Isopropanol

Sammelgel 4% Acrylamid	destilliertes deionisiertes Wasser 30% Acrylamid/ Bis Gelpuffer (0,5 M Tris-HCL, pH 6,8) 10% w/v SDS (Natriumdodecylsulfat) APS (Ammoniumpersulfat) TEMED (Tetramethylethylendiamin)
-------------------------------	---

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Hersteller</u>
Mini-Protean Tetra Cell Tetra Blotting Module	Elektrophorese Apparatur Blotkammer	BioRad, Hercules, CA, USA BioRad, Hercules, CA, USA
Developer and Replenisher		Carestream Health, New York, USA (5023866)
Fixer and Replenisher		Carestream Health, New York, USA (5023866)

<u>Laborinstrumentarien</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Hersteller</u>
Hera Safe	Sterilbank	Heracus, Hanau, Deutschland
VTX-3000 L Mixer Uzusio 5810R	Vortexer Zentrifuge	LMS, Brigachtal, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Metall-Block-Thermostat 100-2	Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland
NanoDrop 2000/ 2000c	Vollspektrum-UV-Vis-Spektralphotometer	Thermo Scientific™, Rockford, USA
Light Cycler 480		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Unimax 2010	Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

<u>Laborchemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (A3678)
Ethanol	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (15523)
Glycerin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (33226)
2-(β)Mercatoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (M3148-25ml)
Methanol 99,8%	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (322415)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland (T 145.2)
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (31434)
Ponceau S	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (78376)
SDS (Natriumdodecylsulfat) ultrapure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland (A1112)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA GE17-1312-01

<u>Primäre Antikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-Actin (Ab-1) mouse monoclonal Antibody (recognizes the ~ 42 kDa α-, β-, and γ isoforms of actin)	1:10 000	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (CP01-1EA)
Anti-Lactate Dehydrogenase A antibody, rabbit polyclonal Cave: cross-reacts with LDHA, B and C	1:10 000	abcam®, Milton, England (ab47010)
Anti-Lactate Dehydrogenase B antibody [60H11] mouse monoclonal	1:5 000	abcam®, Milton, England (ab85319)
LDH-A Antikörper (N-14), polyklonales IgG aus der Ziege, Konzentration 200 µg/ml	1:10 000	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA (sc27230)
<u>Sekundäre Antikörper</u>		
Goat Anti-Mouse IgM, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate	1:10 000	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland (401225)
donkey anti-goat IgG-HRP	1:5 000	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA (sc2020)
Goat anti-mouse IgG F(ab') ₂ , polyclonal antibody (HRP conjugate)	1:5 000	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA (ADI-SAB-100-J)

3 Ergebnisse

3.1 Leistungsdiagnostik

3.1.1 Ausdauerdiagnostik

In der Cross-over-Studie verglichen wir die bei den Akutbelastungen/ Spiroergometrien erreichten Leistungen an der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) und die maximale Sauerstoffaufnahme jeweils vor und nach der Absolvierung eines 8-wöchigen Ausdauer- bzw. Krafttrainingsblockes. Nach dem Ausdauerblock wurde eine signifikante Steigerung der Leistung an der IAS um im Durchschnitt 20,6 Watt erreicht ($p=0,006$). Die maximale Sauerstoffaufnahme stieg ebenfalls signifikant um durchschnittlich 0,46 l/min ($p=0,0023$). Diese Steigerungen wurden nach dem Krafttrainingsblock nicht erreicht: IAS + 3,2 Watt ($p=0,71$), $VO_2\max +0,11$ l/min ($p=0,44$). Ergänzend ist zu sagen, dass es in Bezug auf die durch IAS und $VO_2\max$ wiedergespiegelten Anpassungsreaktionen auf das Training große Unterschiede gibt. Es ist daher von großen interindividuellen Unterschieden auszugehen.

3.2 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR)

3.2.1 Expressionsunterschiede PGC-1 α

Auf Grundlage der Annahme, dass PGC-1 α eine Schlüsselrolle in den durch Training ausgelösten Anpassungen einnimmt, bestimmten wir in den zu verschiedenen Zeitpunkten (vor Beginn des Trainings (0w), nach 3 Wochen Training (3w) und nach 8 Wochen Training/ Ende des Trainingsprogrammes (8w)) entnommenen Muskelbiopsien die Genexpression von PGC-1 α mittels quantitativer real-time PCR (qPCR). Um die Reaktionen einer akuten Belastung von denen durch wiederholt einwirkende Trainingsreize differenzieren zu können, wurden außerdem Muskelproben nach akuter Belastung im Krafraum plus anschließender Belastung auf dem Fahrradergometer gewonnen. Als Referenzgen diente GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Je Probe wurden Triplets angefertigt.

3.2.1.1 Expressionssteigerung von PGC-1 α durch Akutbelastung

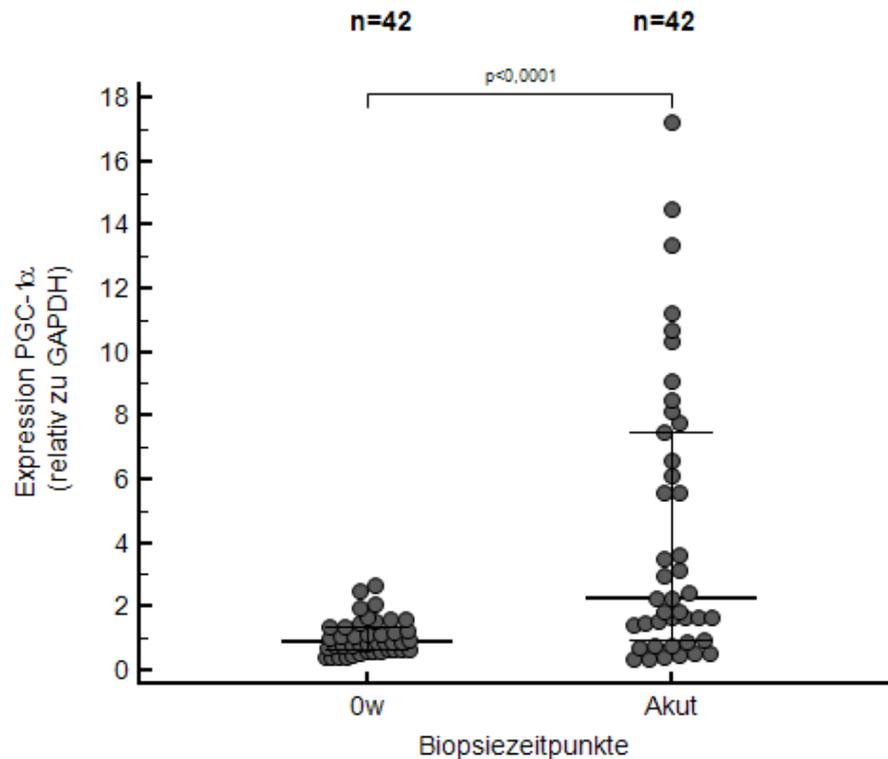


Abbildung 10: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung

PGC-1 α Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung); Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n=42 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha;

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Beim Vergleichen der Genexpression von PGC-1 α in Ruhe und nach erfolgter Akutbelastung zeigte sich eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Steigerung der Expression durch die im Krafraum und auf dem Fahrradergometer absolvierte Akutbelastung (**Abbildung 10**). Der Median stieg von 0,90 auf 2,27 (Wilcoxon-Test: $z = 1,43$, $p < 0,0001$, $n = 42$). Zur weiteren Analyse erfolgte eine differenzierte Aufteilung entsprechend des Trainingsblockes und der Reihenfolge der absolvierten Trainingseinheiten nach der Akutbelastung (dargestellt in den **Abbildung 11** und **Abbildung 12**).

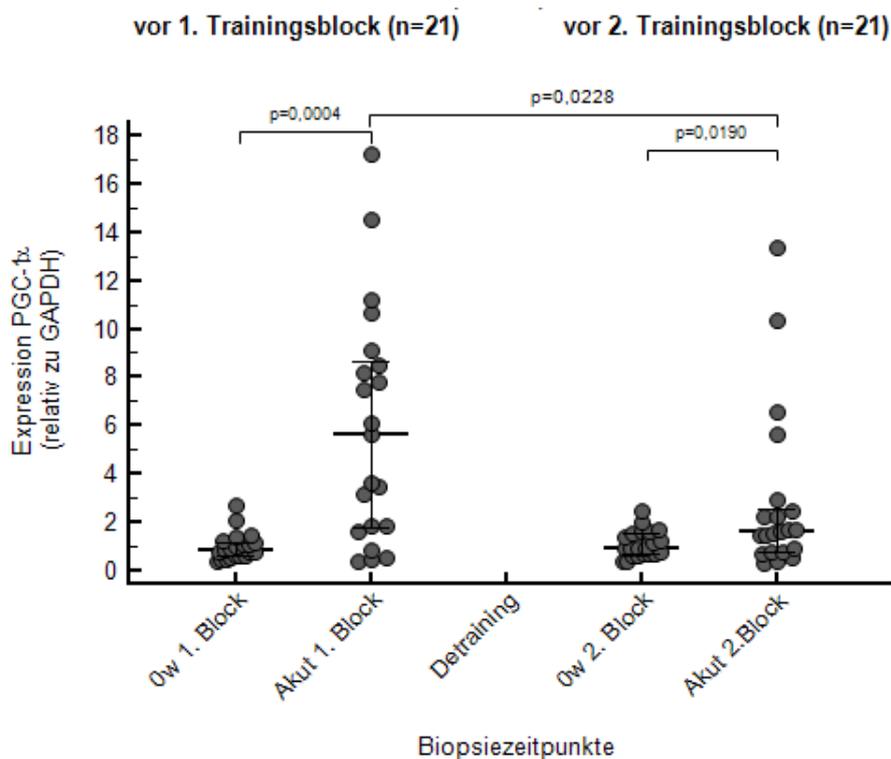


Abbildung 11: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock

PGC-1 α Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des 1. bzw. 2. Trainingsblockes; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar; n = 21 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand, Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; p < 0,05 gekennzeichnet; PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

In **Abbildung 11** zeigte sich ein signifikanter Anstieg (p= 0,0004) der Expression von PGC-1 α im Muskelgewebe nach einer akuten Belastung im Krafraum gefolgt von einer akuten Ausdauerbelastung auf dem Fahrradergometer (Median 5,61) verglichen mit der Ausgangsexpression im ruhenden Muskelgewebe vor Beginn des 1. Trainingsblockes (Median 0,83; Wilcoxon-Test: z = 5,18, p = 0,0004, n = 21). In der vom Aufbau identischen Akutbelastung, zu Beginn des 2. Trainingsblockes nach 12-wöchiger Ruhepause, war dieser Anstieg nach akuter Belastung weiterhin statistisch signifikant (p = 0,019). Der Median stieg von 0,92 auf 1,66 (Wilcoxon-Test: z = 0,38, p = 0,0190, n = 21).

Außerdem gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der 1. und 2 Akutbelastung. Anschließend an die 2. Akutbelastung ist die Expression von PGC-1 α signifikant geringer (Wilcoxon-Test: z = -3,15, p=0,0228, n = 21).

Zwischen den Expressionswerten in Ruhe vor Beginn des 1. Trainingsblock (0w 1. Block) und vor Beginn des 2. Trainingsblockes (0w 2. Block) bestand kein signifikanter Unterschied.

Auch wenn zum Zeitpunkt der Akutbelastungen, welche vor dem jeweiligen Trainingsblock absolviert wurden, noch kein Trainingseinfluss zu erwarten ist, erfolgte zur Vervollständigung die separate Auswertung der Akutbelastungsdaten entsprechend des Trainingsblocks (**Abbildung 12**).

PGC-1 α erhöhte sich bei den 15 Probanden, welche zuerst den Ausdauertrainingsblock und anschließend den Krafttrainingsblock durchliefen, durch die Akutbelastung (Median = 7,50) signifikant verglichen mit dem Ausgangswert (Median = 0,76; Wilcoxon-Test: $z = 6,86$, $p = 0,0001$, $n = 15$). Ein Anstieg des Wertes war bei 14 Probanden vorhanden, bei einem Probanden fiel der Wert gering. Nach Absolvierung des Ausdauerblockes und einer 12-wöchigen Ruhephase war der Expressionsanstieg nach Akutbelastung (Median = 1,52) weiterhin signifikant zur Ruheexpression (Median = 0,77; Wilcoxon-Test: $z = 0,38$, $p = 0,0302$, $n = 15$). Nach der identischen Belastung konnte nur noch bei 10 Probanden ein Expressionsanstieg gemessen werden. Bei 5 Probanden wurde eine geringere Expression verglichen mit dem Ruhewert gefunden. Die Ruhewerte unterschieden sich nicht signifikant. Der Expressionswert nach der 2. Akutbelastung war wiederum signifikant geringer wie nach der 1. Akutbelastung (Wilcoxon-Test: $z = -6,24$, $p = 0,0012$, $n = 15$).

In der Gruppe der 6 Probanden, welche zuerst den Krafttrainingsblock und anschließend den Ausdauerblock absolvierten waren keine signifikanten Expressionsunterschiede durch die absolvierte Akutbelastung vorhanden (**Abbildung 12**).

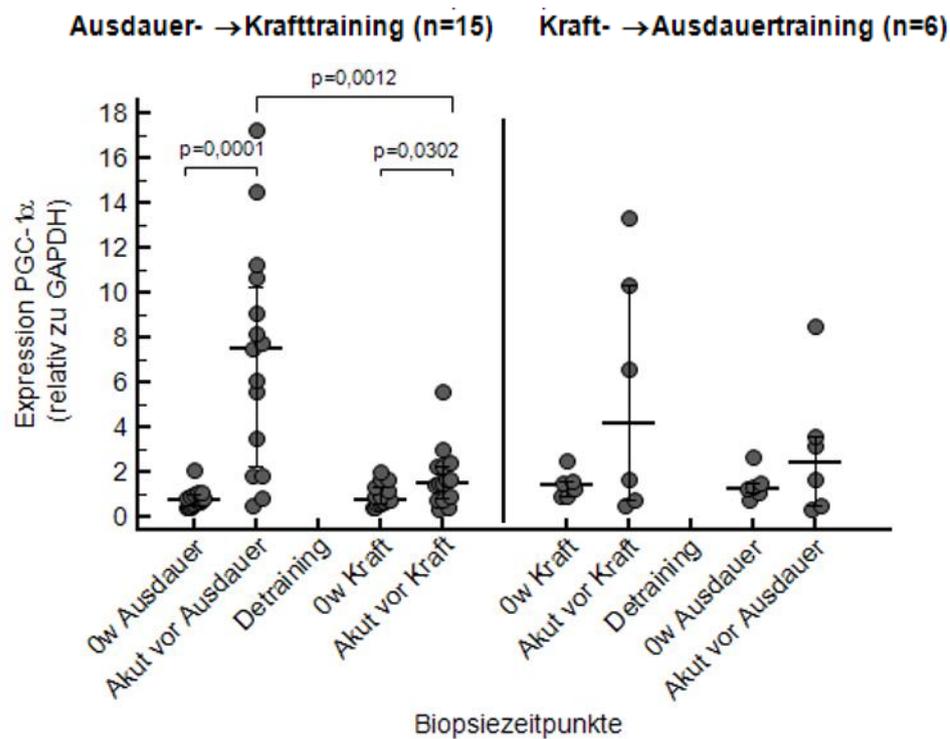


Abbildung 12: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge

PGC-1 α Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des Ausdauer- bzw. Krafttrainingsprogrammes; Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar; n = 15 bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand, Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; p < 0,05 gekennzeichnet; PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

3.2.1.2 Steigerung der Ruheexpression von PGC-1 α durch Ausdauertraining, nicht durch Krafttraining

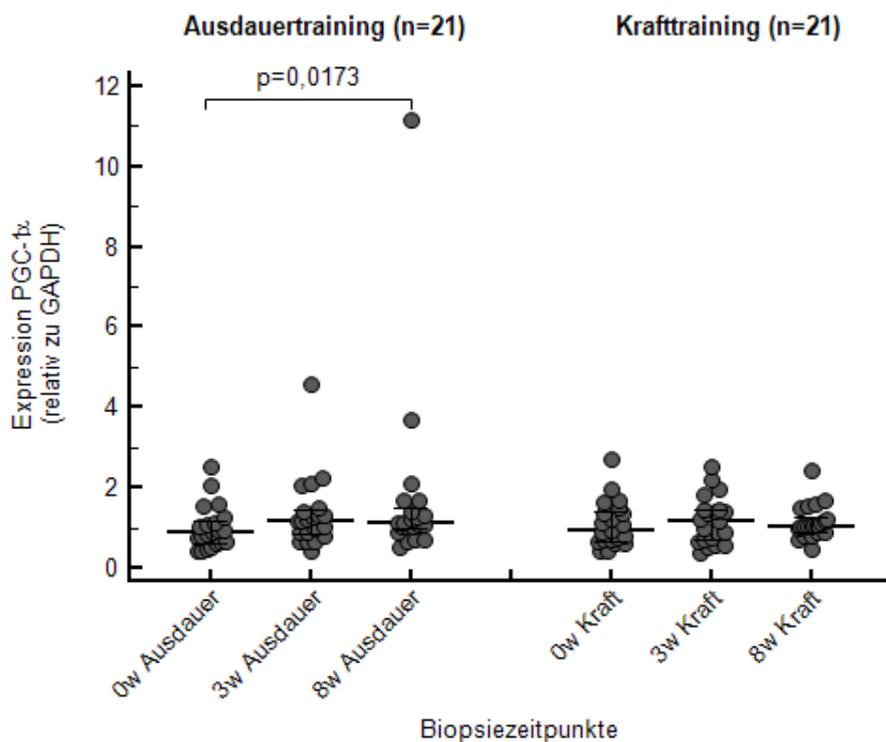


Abbildung 13: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n=21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft);

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 21 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; p < 0,05 gekennzeichnet;

PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha;

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Die in **Abbildung 13** dargestellten Expressionswerte für PGC-1 α waren ausschließlich nach Ende des Ausdauertrainingsblockes (Median = 1,11) signifikant höher wie vor Beginn des Trainingsblockes (Median = 0,89; Wilcoxon-Test: z = 0,11, p = 0,0173, n = 21).

Zwischen den übrigen Messungen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

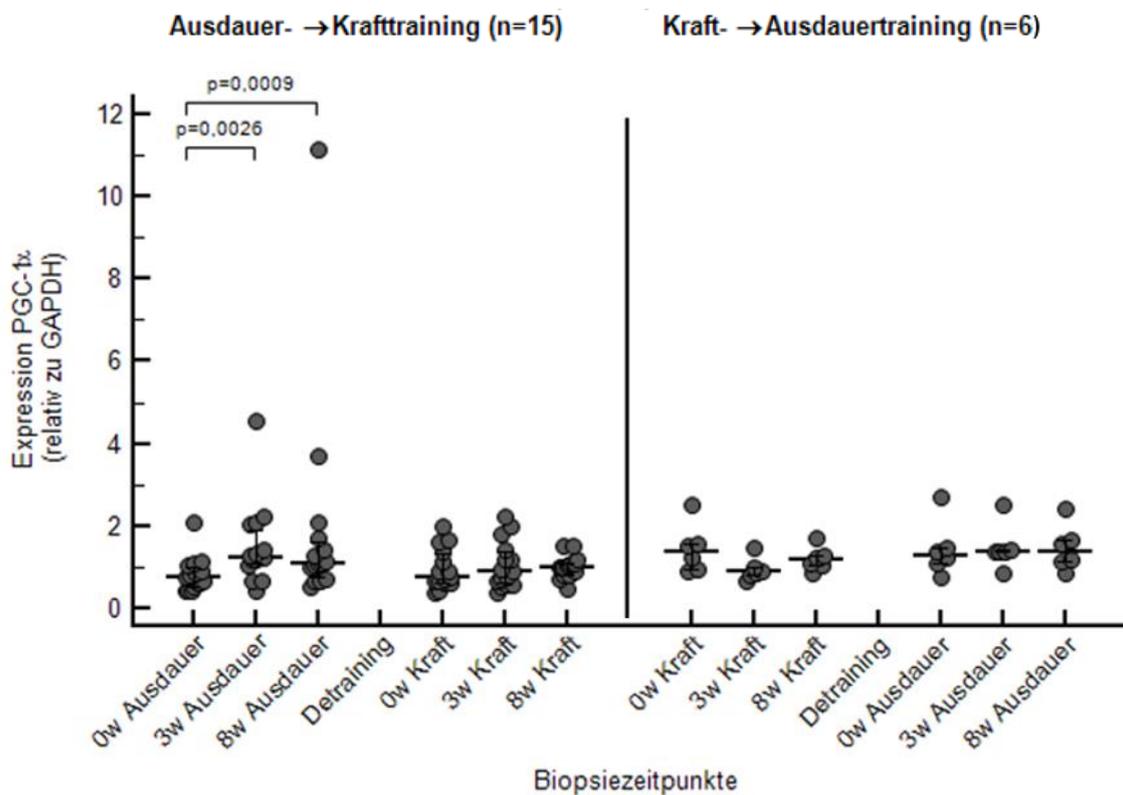


Abbildung 14: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der Trainingsreihenfolge

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft).

Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock;

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 15 bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt; Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; p < 0,05 gekennzeichnet;

PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha;

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Die in **Abbildung 14** dargestellte PGC-1 α Expression, getrennt nach der Reihenfolge des absolvierten Trainingsprogrammes, zeigt einen signifikanten Anstieg der Expression zur Ruheexpression (Median = 0,76), nach 3 (Median = 1,24; Wilcoxon-Test: z = 0,42, p = 0,0026, n = 15) und 8 Wochen Ausdauertraining (Median = 1,07; Wilcoxon-Test: z = 0,43, p = 0,0009, n = 15), in der Gruppe mit Beginn mit dem Ausdauertrainingsblock. Keine signifikanten Veränderungen in der Gruppe der 6 Probanden mit Beginn Krafttraining.

3.2.2 Expressionsunterschiede LDH-A

Aufgrund der essenziellen Rolle der LDH Enzyme im Laktatstoffwechsel wurde die Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach des von unseren Probanden absolvierten Trainingsprogrammes in Muskelproben mittels qPCR bestimmt. Untersucht wurden Muskelproben vor Beginn des Trainings (0w), nach 3 Wochen Training (3w) und nach 8 Wochen Training/ Ende des Trainingsprogrammes (8w). Zusätzlich wurde eine Akutbelastung mit anschließender Muskelbiopsieentnahme durchgeführt, um deren Einfluss auf die Genexpression zu bestimmen.

Je Proben wurden Triplets angefertigt und die Werte ins Verhältnis zum Referenzgen GAPDH gesetzt.

3.2.2.1 Expressionssteigerung von LDH-A durch Akutbelastung

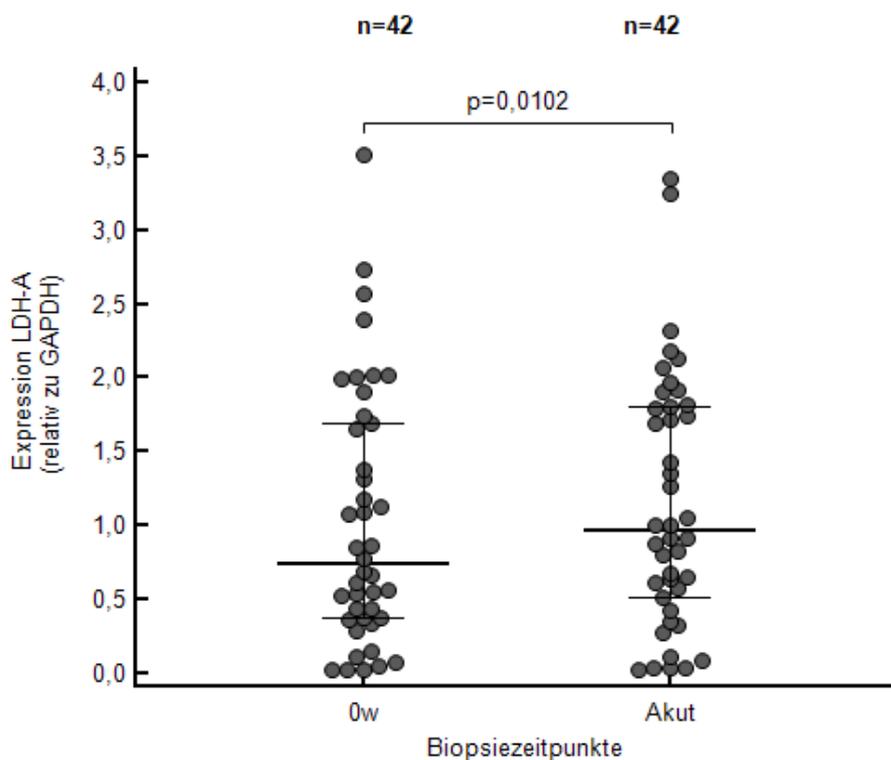


Abbildung 15: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung

LDH-A Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung); Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 42 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanz ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

In der zuvor gezeigten **Abbildung 15** wurde eine signifikante Expressionssteigerung (Median 0,74 zu 0,96; Wilcoxon-Test: $z = 0,13$, $p = 0,0102$, $n = 42$) durch die in Krafraum und auf dem Ergometer durchgeführte Akutbelastung gemessen.

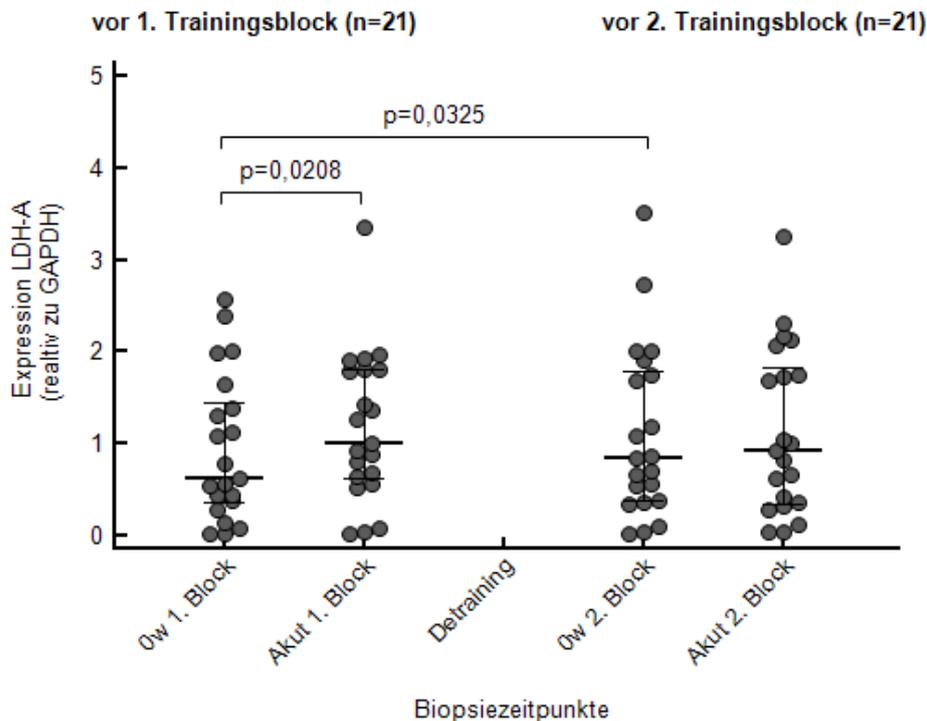


Abbildung 16: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock

LDH-A Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des 1. bzw. 2. Trainingsblockes; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

$n = 21$ Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Beobachtet wurde eine signifikant höhere (Wilcoxon-Test: $z = 0,14$, $p = 0,0208$, $n = 21$) LDH-A Expression relativ zur GAPDH Expression (Akut 1. Block; Median = 1,00) durch die absolvierte Akutbelastung auf dem Ergometer und im Krafraum verglichen mit der Expression im Muskelgewebe vor Belastung (0w 1. Block; Median = 0,61). Eine entsprechende signifikante Steigerung vor Beginn des 2. Trainingsblockes war nicht nachzuweisen (**Abbildung 16**).

Im Vergleich der Expressionen in Ruhe vor dem 1. Trainingsblock (0w 1. Block) mit vor Beginn des 2. Trainingsblocks (0w 2. Block) zeigte sich eine signifikant höhere Expression (Median = 0,85) von LDH-A relativ zu GAPDH vor Beginn des 2. Trainingsblockes (0w 2. Block). Wilcoxon-Test: $z = 0,13$, $p = 0,0325$, $n = 21$).

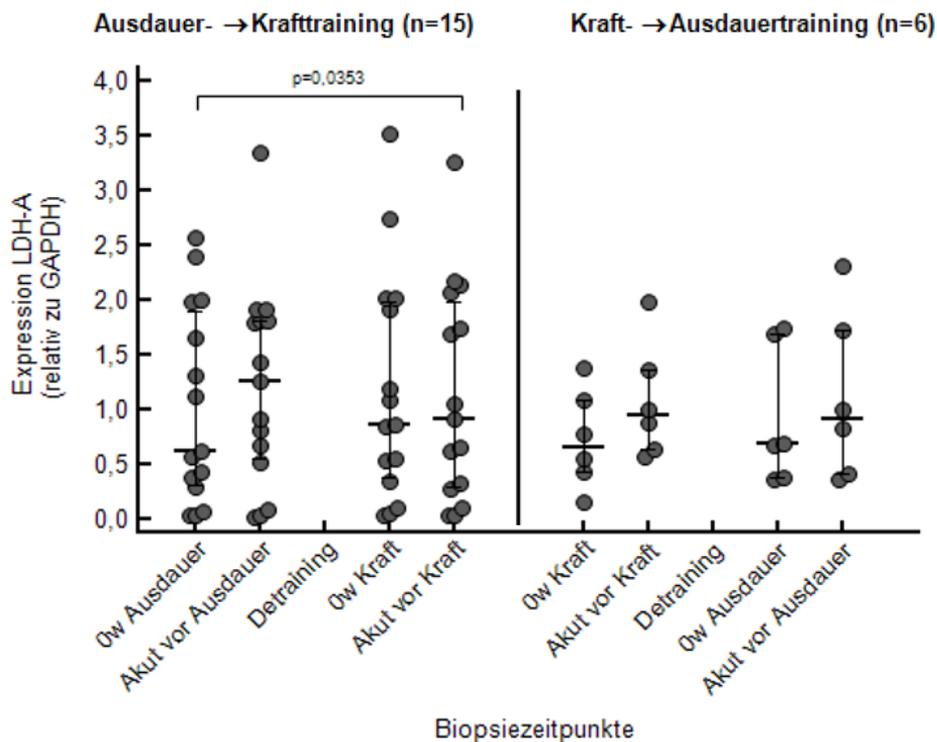


Abbildung 17: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge

LDH-A Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des Ausdauer- bzw. Krafttrainingsprogrammes; Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 15 bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Ausschließlich signifikante Änderung der Expression zwischen Ruheexpression vor Beginn des 1. Trainingsblockes (Median = 0,61) und nach erfolgter Akutbelastung vor Beginn des 2. Trainingsblockes (Median = 0,92) in der Gruppe der 15 Probanden mit Beginn im Ausdauertrainingsblock (Wilcoxon-Test: $z = 0,05$, $p = 0,0353$, $n = 15$) (Abbildung 17).

3.2.2.2 Steigerung der Ruheexpression von LDH-A zu Trainingsbeginn unabhängig von der Trainingsmodalität

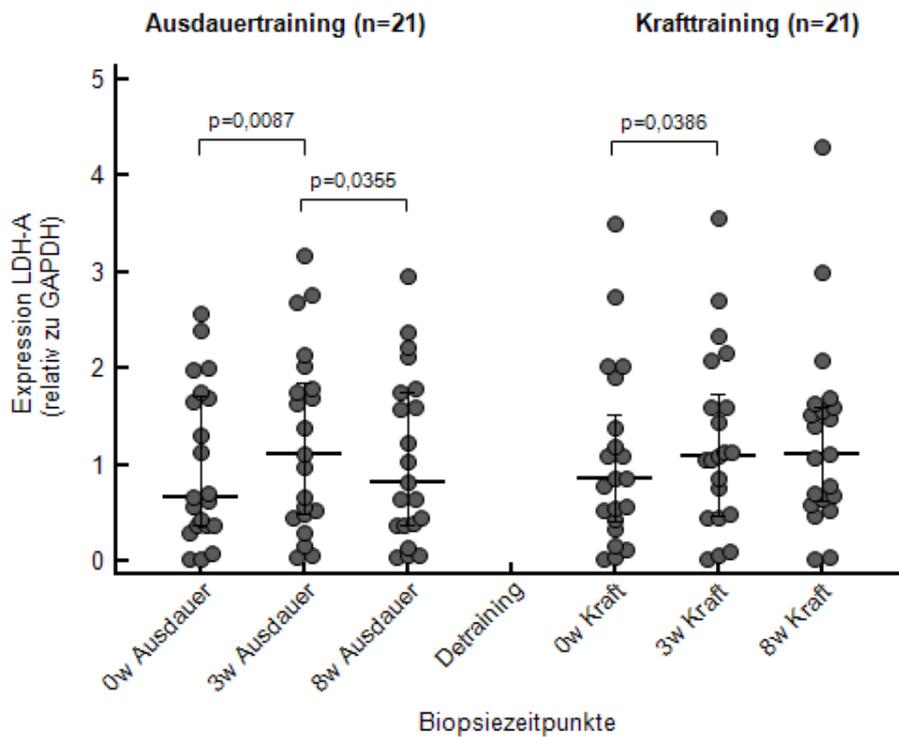


Abbildung 18: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft);

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 21 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Signifikant höherer Expression von LDH-A relativ zu GAPDH nach 3 Wochen

Ausdauertraining (Median = 1,12) verglichen mit dem Wert vor Trainingsbeginn

(Median = 0,67; Wilcoxon-Test: $z = 0,19$, $p=0,0087$, $n = 21$) dargestellt in **Abbildung 18**.

Nach 8 Wochen Ausdauertraining (Median = 0,82) signifikanter Abfall der Geneexpression verglichen mit dem Wert nach 3 Wochen Training (Wilcoxon-Test: $z = -0,11$, $p = 0,0355$,

$n = 21$). Kein signifikanter Unterschied zwischen Beginn und Ende des

Ausdauertrainingsblockes. Ebenfalls signifikant höhere Expression von LDH-A nach

3 Wochen Krafttraining (Median = 1,09) zum Ausgangswert (Median = 0,85;

Wilcoxon-Test: $z = 0,22$, $p = 0,0386$, $n = 21$)). Kein signifikanter Unterschied zwischen

den Ausgangswerten (0w Ausdauer, 0w Kraft).

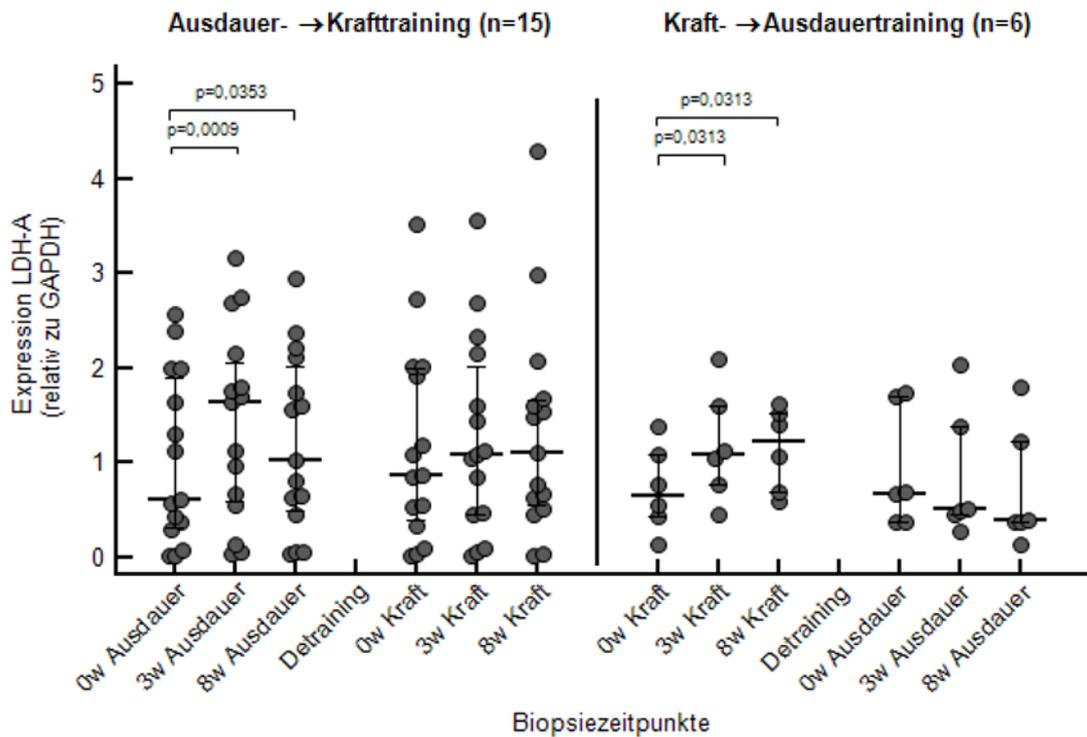


Abbildung 19: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der Trainingsreihenfolge

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft).

Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock;

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 15 bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt; Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Bei getrennter Auswertung entsprechend der absolvierten Trainingsreihenfolge

(**Abbildung 19**) bestand im jeweils 1. Trainingsblock, unabhängig ob dieser Ausdauer- oder Krafttraining beinhaltete, eine signifikante Steigerung der Expressionswerte von LDH-A nach 3 Wochen (Median 1. Block 3w Ausdauer = 1,64 bzw. 1. Block 3w Kraft = 1,01) und 8 Wochen (Median 1. Block 8w Ausdauer 1,02 bzw. 1. Block 8w Kraft = 1,23) zur Ausgangsexpression (Median 1. Block 0w Ausdauer = 0,61 bzw. 1. Block 0w Kraft = 0,66). Hierbei war bei Beginn mit dem Ausdauerblock der Wert nach 8 Wochen geringer wie nach 3 Wochen. Im Wilcoxon-Test ergaben sich für den Beginn mit Ausdauertraining somit folgenden Ergebnisse verglichen mit der Ausgangsexpression: 3 Wochen Ausdauertraining ($z = 0,38$, $p = 0,0009$, $n = 15$) und 8 Wochen Ausdauertraining ($z = 0,08$, $p = 0,0353$, $n = 15$). Bei Beginn mit Krafttraining waren es: 3 Wochen Krafttraining ($z = 0,43$, $p = 0,0313$, $n = 6$) und 8 Wochen Krafttraining ($z = 0,48$, $p = 0,0313$, $n = 6$).

3.2.3 Expressionsunterschiede LDH-B

Analog der Genexpressionsanalyse von LDH-A wurde die Analyse der Genexpression von LDH-B durchgeführt.

3.2.3.1 konstante Expression von LDH-B trotz Akutbelastung

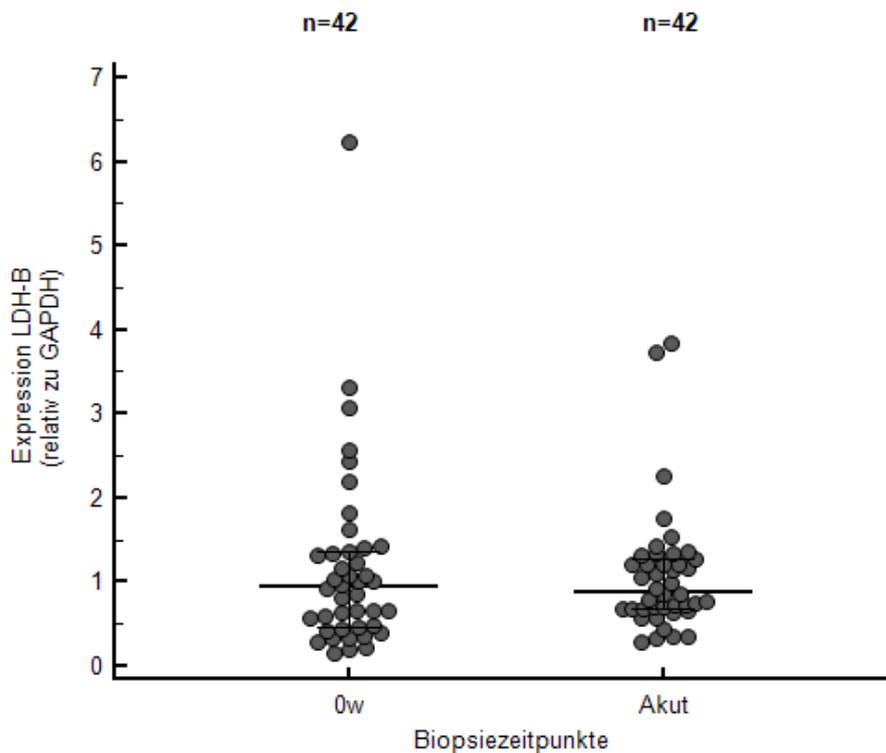


Abbildung 20: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung

LDH-B Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung); Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 42 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-B = Laktatdehydrogenase-B, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Kein signifikanter Unterschied zwischen der Ruheexpression (Median = 0,94) und der Expression nach erfolgter Akutbelastung (Median = 0,89) bei LDH-B (**Abbildung 20**).

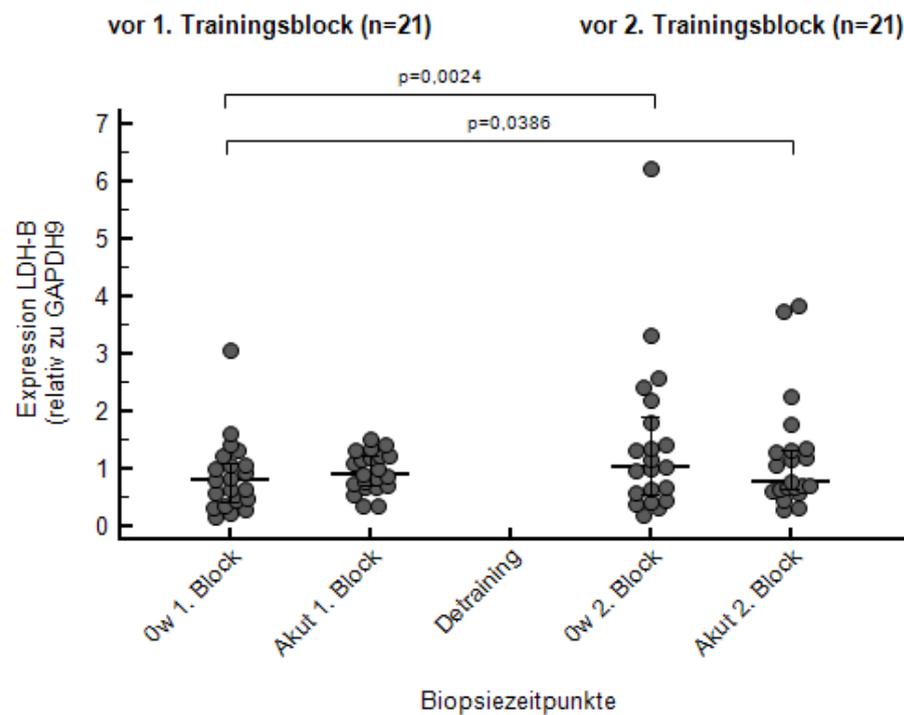


Abbildung 21: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock

LDH-B Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des 1. bzw. 2. Trainingsblockes; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 21 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-B = Laktatdehydrogenase-B, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Keine signifikante Änderung der Expression von LDH-B relativ zu GAPDH durch die durchgeführte Akutbelastung (Kraft- gefolgt von Ausdauerakutbelastung auf dem Fahrradergometer) vor Beginn des 1. Trainingsblockes. Ebenfalls keine Signifikanz zwischen Ruheexpression und Expression nach der Akutbelastung vor Beginn des 2. Trainingsblocks siehe **Abbildung 21**.

Signifikant ($p=0,0024$) höhere Expression von LDH-B vor Beginn des 2. Trainingsblockes (Median = 1,03) zur Ruheexpression vor Beginn des 1. Trainingsblockes (Median = 0,80; Wilcoxon-Test: $z = 0,23$, $p = 0,0024$, $n = 21$). Ebenfalls signifikant höhere Expression nach durchgeführter Akutbelastung auf dem Ergometer und im Kraftraum (Median 0,79) zur Ruheexpression vor Beginn des 1. Trainingsblockes (Wilcoxon-Test: $z = 0,13$, $p = 0,0386$, $n = 21$).

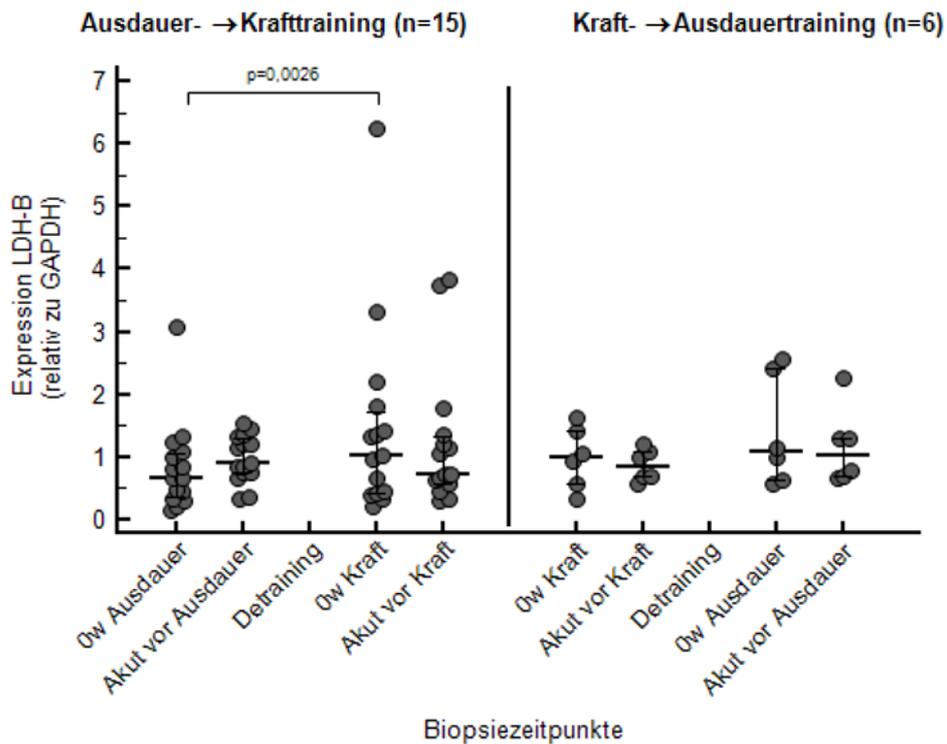


Abbildung 22: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge

LDH-B Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des Ausdauer- bzw. Krafttrainingsprogrammes; Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 15 bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-B = Laktatdehydrogenase-B, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Abbildung 22 zeigt die getrennte Analyse entsprechend der Trainingsreihenfolge, kam es durch die Akutbelastungen zu keinen signifikanten Änderungen innerhalb des Kollektives von 15 bzw. 6 Probanden.

Die LDH-B Ruheexpression war bei Beginn mit dem Ausdauertrainingsblock vor Beginn des 2. Trainingsblocks signifikant höher (Median = 1,04), wie vor Beginn des

1. Trainingsblockes (Median = 0,66) (Wilcoxon-Test: $z = 0,24$, $p = 0,0026$, $n = 15$).

3.2.3.2 Steigerung der Ruheexpression von LDH-B im Trainingsverlauf durch Ausdauertraining stärker ausgeprägt

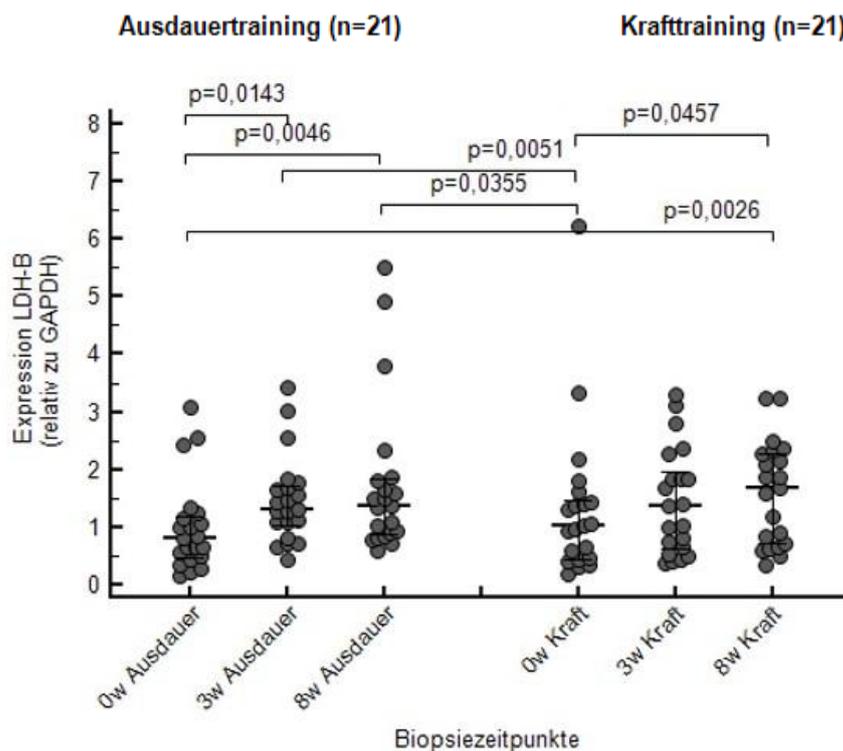


Abbildung 23: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft).

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 21 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-B = Laktatdehydrogenase-B, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Die aus den entnommenen Muskelbiopsien mittels Isolierung, Transkription und qPCR bestimmten LDH-B Expressionswerte zeigen einen Anstieg verglichen mit dem Ausgangswert und im Trainingsverlauf (**Abbildung 23**). Im Vergleich zwischen Ausdauer- und Krafttrainingsblock fand durch Ausdauertraining eine stärkere Steigerung statt. Bei beiden Trainingsformen ist ein Anstieg bereits nach 3 Wochen Training erkennbar, im weiteren Verlauf kam es zu einer weiteren Steigerung, sodass nach 8 Wochen die Werte durch beide Trainingsprogramme signifikant erhöht waren. Signifikante Steigerung zum Ausgangswert (Median = 0,80) bereits nach 3 Wochen Ausdauertraining (Median = 1,29; Wilcoxon-Test: $z = 0,50$, $p = 0,0143$, $n = 21$) und nach 8 Wochen Ausdauertraining

(Median = 1,38; Wilcoxon-Test: $z = 0,45$, $p = 0,0046$, $n = 21$). Durch Krafttraining ebenfalls signifikante Steigerung der LDH-B Expression zum Ausgangswert vor Trainingsbeginn (Median = 1,03) nach 8 Wochen Krafttraining (Median = 1,68; Wilcoxon-Test: $z = 0,36$, $p = 0,0457$, $n = 21$). Zusätzlich signifikante Änderungen durch Interaktionen, jedoch nicht zu vergleichbaren Zeitpunkten.

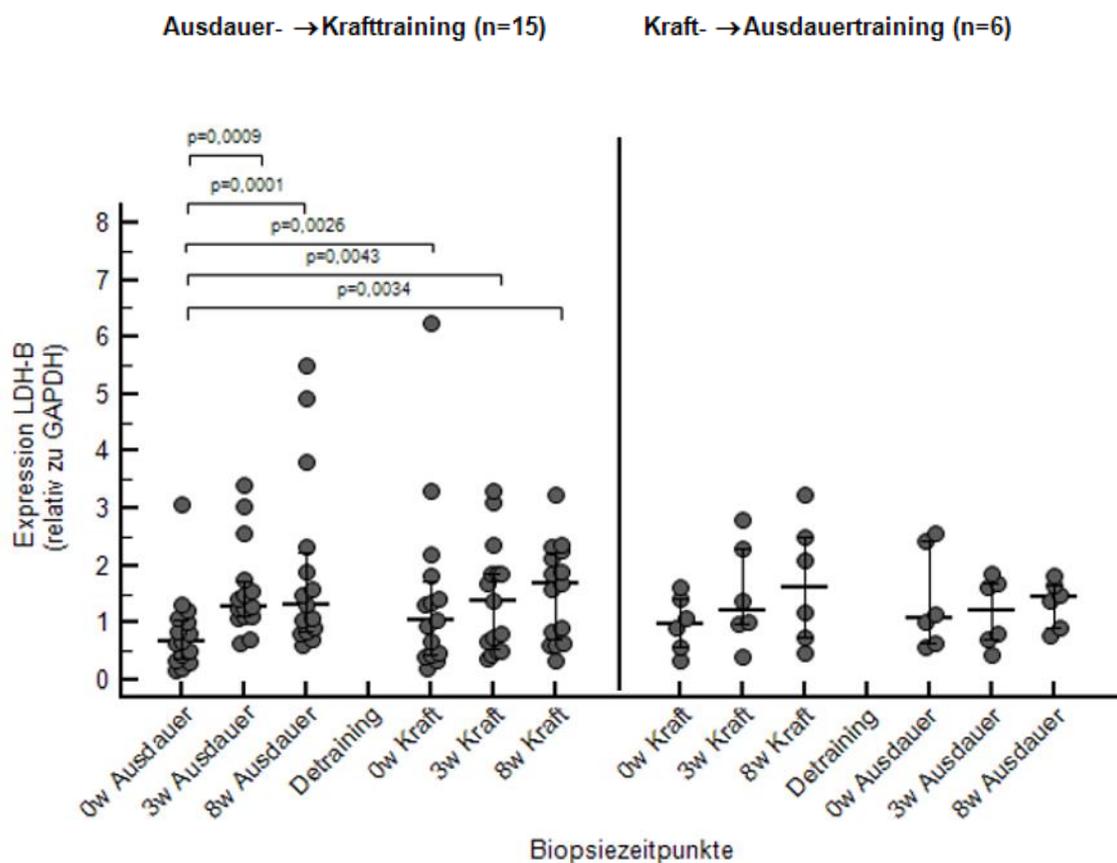


Abbildung 24: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der Trainingsreihenfolge

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft).

Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock;

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

$n = 15$ bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt; Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-B = Laktatdehydrogenase-B, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

In der Gruppe, welche zuerst den Ausdauer- und anschließend den Krafttrainingsblock absolvierte, waren alle im Trainingsverlauf gemessenen Expressionswerte signifikant höher wie die Ausgangsexpression vor Trainingsbeginn (Median = 0,66) **Abbildung 24.**

Im einzelnen waren diese während des Ausdauertrainingsblockes nach 3 Wochen: Median = 1,29; Wilcoxon-Test: $z = 0,55$, $p = 0,0009$, $n = 15$ und nach 8 Wochen: Median = 1,33; Wilcoxon-Test: $z = 0,52$, $p = 0,0001$, $n = 15$. Während des nach der 3-monatigen Detrainingsphase begonnen Krafttrainingsblock vor Beginn (Median = 1,04; Wilcoxon-Test: $z = 0,24$, $p = 0,0026$, $n = 15$), nach 3 Wochen Krafttraining (Median = 1,39; Wilcoxon-Test: $z = 0,46$, $p = 0,0043$, $n = 15$) und nach 8 Wochen Krafttraining (Median = 1,68; Wilcoxon-Test: $z = 0,61$, $p = 0,0034$, $n = 15$) jeweils zum Ausgangswert vor Trainingsbeginn im Ausdauerblock. Dabei kam es unter den Expressionswerten zu späteren Zeitpunkten zu keinen weiteren signifikanten Tendenzen untereinander.

3.2.4 LDH-A/LDH-B-Ratio

Zur weiteren Analyse und besseren Beurteilung der bestimmten Genexpressionswerte wurde aus den in den beiden vorangegangenen Abschnitten dargestellten und analysierten qPCR-Daten für LDH-A und LDH-B der jeweilige Quotient berechnet und ebenfalls graphisch dargestellt.

3.2.4.1 LDH-A/LDH-B-Ratio von Akutbelastung unbeeinflusst

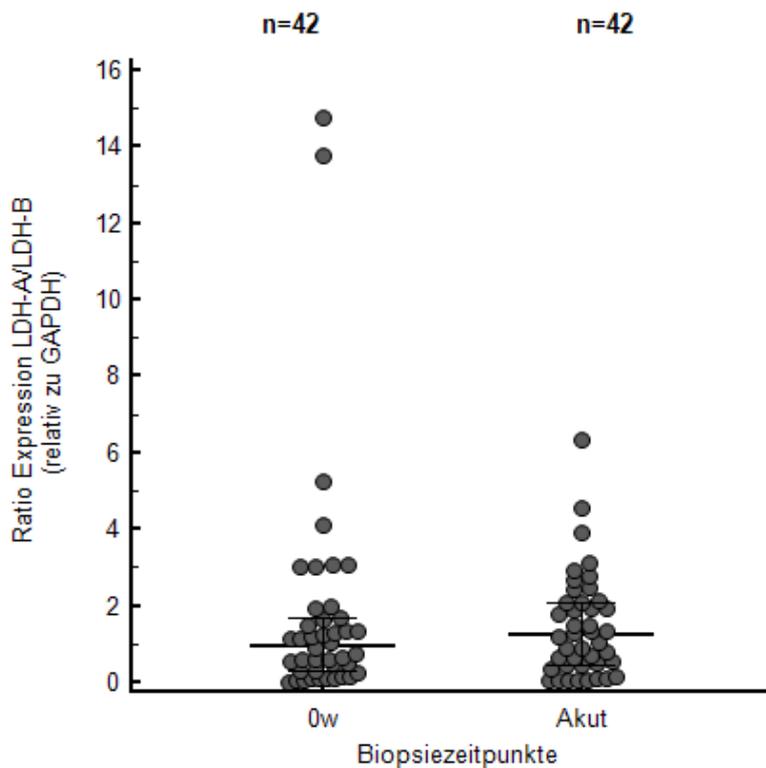


Abbildung 25: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung

Quotient LDH-A/LDH-B Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung); Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 42 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, LDH-B = Laktatdehydrogenase-B,

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Keine signifikante Veränderung der Ratio durch die absolvierte Akutbelastung

(Abbildung 25). Median der Ruheexpression 0,96 verglichen mit 1,23 nach Akutbelastung im Krafraum und auf dem Fahrradergometer.

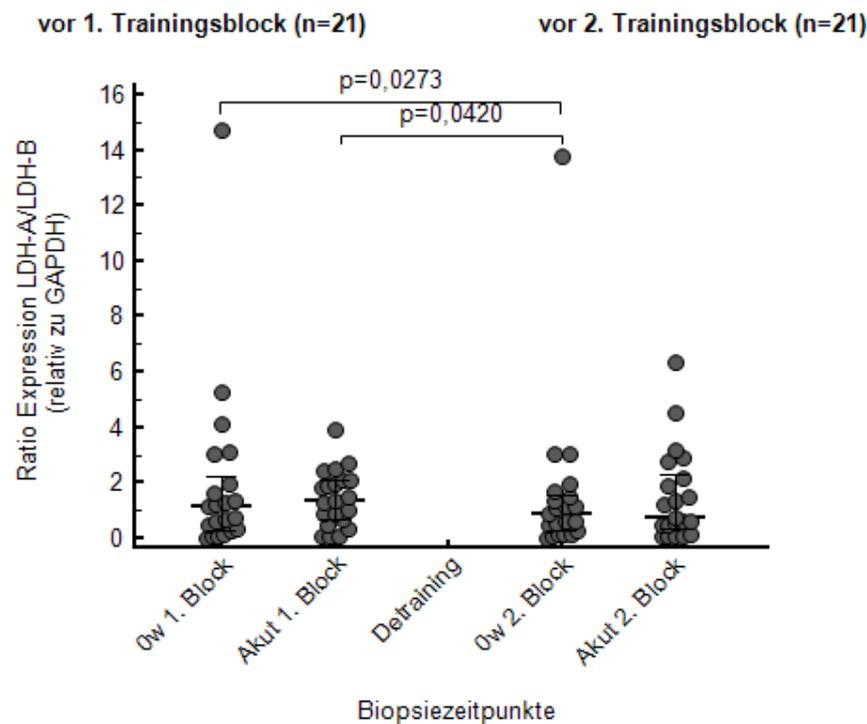


Abbildung 26: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock

Quotient LDH-A/LDH-B Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des 1. bzw. 2. Trainingsblockes; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 21 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, LDH-B = Laktatdehydrogenase-B,

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Signifikante Abnahme der LDH-A/ LDH-B-Ratio vor Beginn des 2. Trainingsblock (Median = 0,87) verglichen mit vor dem 1. Trainingsblock (Median = 1,12) (Wilcoxon-Test: $z = 0,13$, $n = 0,0273$, $n = 21$) (**Abbildung 26**). Keine signifikante Änderung der Genexpressionsratio durch die absolvierte Akutbelastung (Kraft- und Ausdauer) im Vergleich der Werte vor und nach Belastung zu beiden Akutbelastungszeitpunkten. Des Weiteren findet sich basierend auf der im Trainingsverlauf reduzierten Ratio vor Beginn des 2. Trainingsblockes ein signifikanter Unterschied zu dem Wert nach der Akutbelastung vor Beginn des 1. Trainingsblockes (Median = 1,35; Wilcoxon-Test: $z = 0,25$, $p = 0,0420$, $n = 21$). Dieser Unterschied besteht nicht zwischen der Ruheexpression und der Akutbelastung vor 2. Trainingsblock.

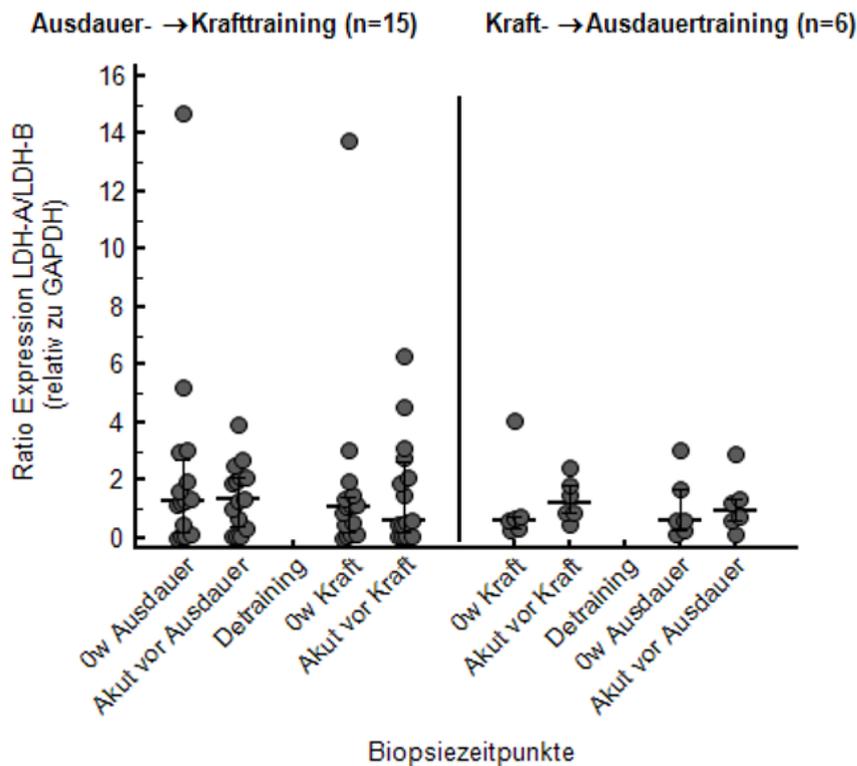


Abbildung 27: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge

Quotient LDH-A/LDH-B Expression in Ruhe bzw. nach Akutbelastung (erst Kraft- dann Ausdauerbelastung) vor Trainingsbeginn des Ausdauer- bzw. Krafttrainingsprogrammes; Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock; Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar; n = 15 bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; p < 0,05 gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, LDH-B = Laktatdehydrogenase-B,

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Keine signifikanten Veränderungen zwischen den Ruheexpressionen oder durch die Akutbelastungen bei getrennter Analyse entsprechend der absolvierten Trainingsreihenfolge (**Abbildung 27**).

3.2.4.2 Abnahme der LDH-A/LDH-B-Ratio im Trainingsverlauf ausschließlich durch Ausdauertraining

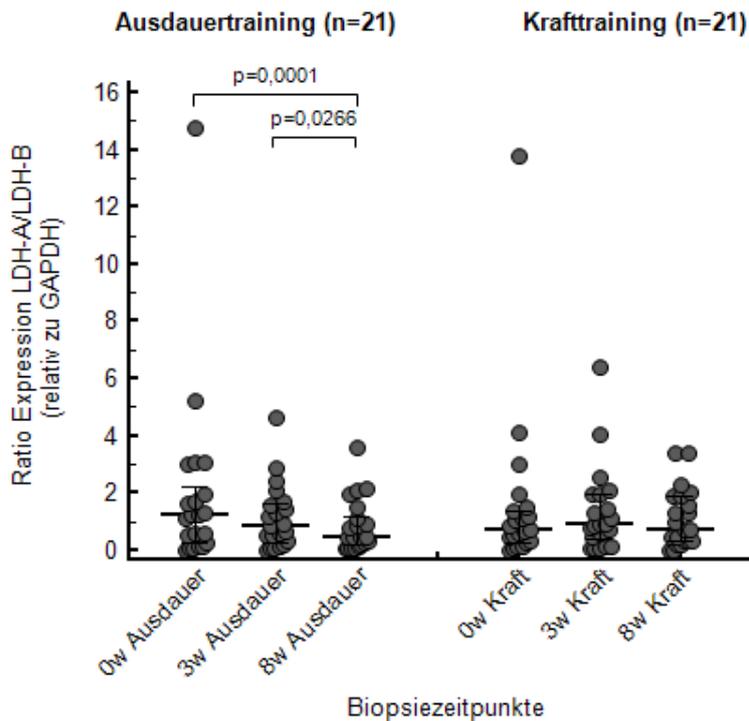


Abbildung 28: qPCR- Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft).

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 21 Probanden/ Proben je Zeitpunkt, Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, LDH-B = Laktatdehydrogenase-B,

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Die in **Abbildung 28** dargestellten Quotienten zeigten eine deutlich fallende Tendenz im Trainingsverlauf im Ausdauertrainingsblock. Verglichen mit dem Ausgangswert (Median = 1,24) führte das 8-wöchige Ausdauertrainingsprogramm zu einer signifikanten Reduktion der LDH-A/LDH-B-Ratio (Median = 0,44; Wilcoxon-Test: $z = -0,73$, $p = 0,0001$, $n = 21$). Ferner war allein die Reduktion während der letzten 5 Wochen (Median = 0,82 auf 0,44) signifikant (Wilcoxon-Test: $z = -0,12$, $p = 0,0266$, $n = 21$). Die Veränderungen im Kraftblock ergaben keine Signifikanzen.

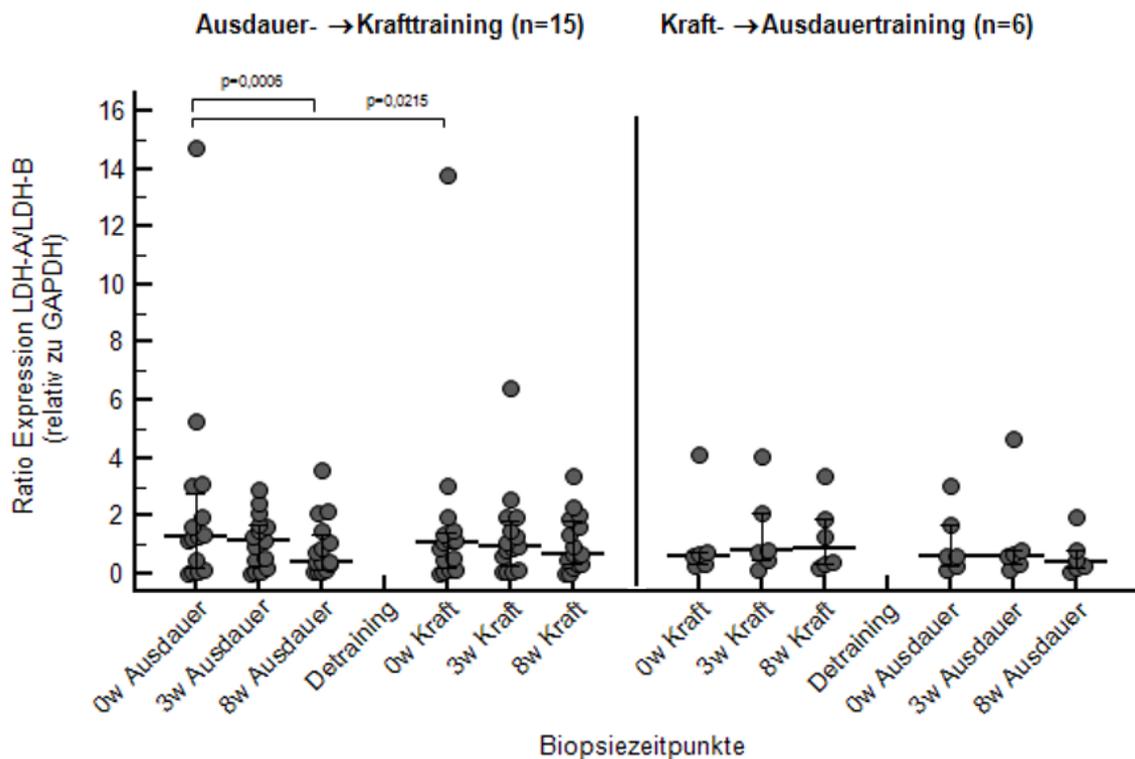


Abbildung 29: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der Trainingsreihenfolge

Bestimmung aus Muskelbiopsien ohne vorherige Belastung zu den Zeitpunkten: vor Trainingsbeginn Ausdauerblock (0w Ausdauer), nach 3 Wochen Ausdauertraining (3w Ausdauer), nach 8 Wochen Ausdauertraining/ Ende des Trainingsblockes (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes (0w Kraft, 3w Kraft, 8w Kraft).

Vergleich zwischen dem Beginn mit Ausdauertrainingsblock vs. Beginn mit Krafttrainingsblock;

Datenpunkte stellen Mittelwerte der je Probe angefertigten qPCR Triplets dar;

n = 15 bzw. 6 Probanden/ Proben je Zeitpunkt; Median und Interquartilsabstand,

Signifikanzen ermittelt mit Wilcoxon-Test; $p < 0,05$ gekennzeichnet;

LDH-A = Laktatdehydrogenase-A, LDH-B = Laktatdehydrogenase-B,

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Abbildung 29 zeigt eine deutliche und hochsignifikante Abnahme der

LDH-A/LDH-B-Ratio in der Gruppe der Teilnehmer mit Beginn Ausdauertraining während des Ausdauerblockes. Zwischen dem Ausgangswert (Median = 1,27) und dem Wert nach 8 Wochen Ausdauertraining (Median = 0,44) kam es bei 13 der 14 Teilnehmer zu einer Reduktion der Ratio (Wilcoxon-Test: $z = -0,80$, $p = 0,0006$, $n = 15$).

Im Krafttrainingsblock kam es über den gleichen Trainingszeitraum zu keiner signifikanten Veränderung.

Eine weitere signifikante Reduktion der Ratio ($p=0,0215$) fand sich zwischen dem Ruhewert vor Trainingsbeginn (Median = 1,27) und dem Ruhewert anschließend an die 3-monatige Detrainingsphase nach absolviertem Ausdauertrainingsblock (Median = 1,06; Wilcoxon-Test: $z = -0,13$, $p = 0,0215$, $n = 15$).

In der Gruppe der 6 Probanden, die mit dem Krafttraining begonnen hatten, war die Expression von Beginn des Ausdauerblockes (Median = 0,59) signifikant geringer wie nach den ersten 3 Wochen des vor der Detrainingsphase absolvierten Krafttrainings (Median = 0,78; Wilcoxon-Test: $z = -0,20$, $p = 0,0313$, $n = 6$).

3.3 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot

Anschließend an die Genexpressionsanalyse mittels qPCR untersuchten wir als weiterführenden Schritt die Expression auf Proteinebene der entsprechenden Genprodukte: LDH-A und LDH-B. Somit wurde es uns möglich, zu evaluieren, ob sich die Genexpressionsveränderungen auch auf Proteinebene widerspiegeln.

3.3.1 LDH-A Proteinexpression

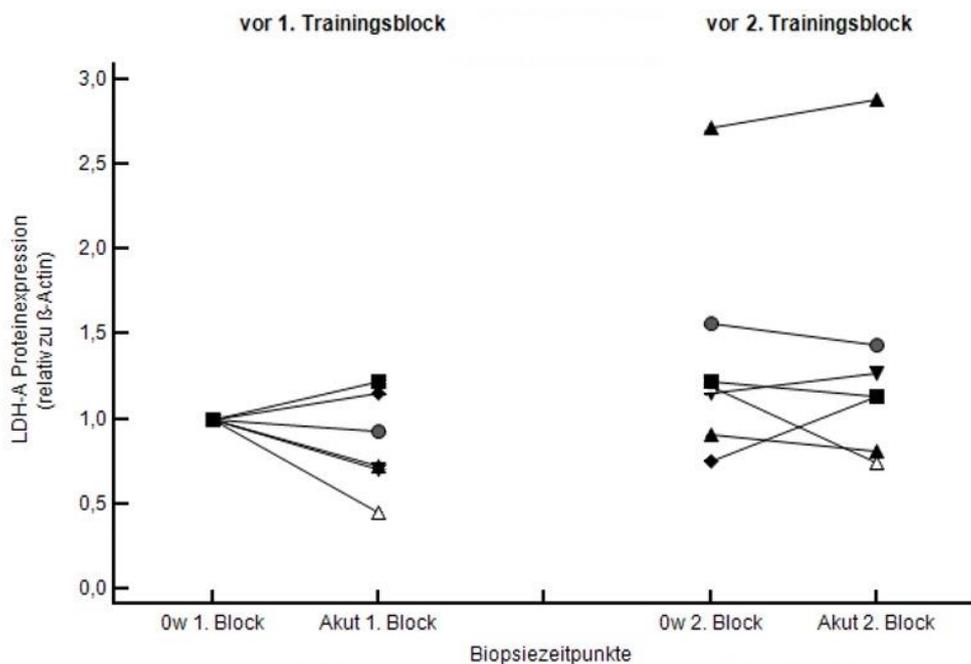


Abbildung 30: Proteinexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu β -Actin; Einfluss Akutbelastung

Einfluss einer Akutbelastung (Kraftraum und Fahrradergometer) auf die Proteinexpression von LDH-A Bestimmung in Muskelbiopsien der Ulmer Probanden mittels Western Blot vor Beginn des 1. bzw. 2. Trainingsblockes (0w 1. bzw 2. Block) und nach Akutbelastung (Akut 1. bzw. 2. Block); Western Blot je Probe 1x mal durchgeführt; Werte bezogen auf Menge von β -Actin

$n = 7$ Probanden/ Proben je Zeitpunkt (bzw. 6 Akut 1. Block) (spezifisches Symbol je Proband);

LDH-A =Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Sowohl durch die 1. wie auch 2. Akutbelastung kam es bei jeweils 4 der 6 bzw. 7 Probanden zu einem Abfall der LDH-A Proteinexpression gegenüber der jeweiligen

Ruheexpression. Die Ruheexpression vor Beginn des 2. Trainingsblockes war bei 5 Probanden vor Beginn des 2. Trainingsblockes erhöht (**Abbildung 30**).

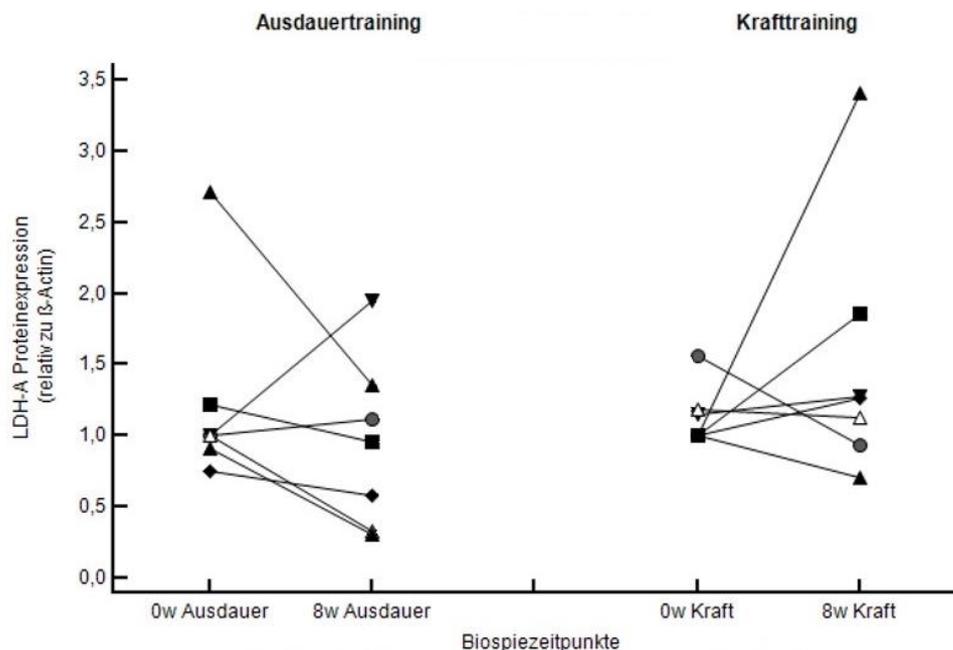


Abbildung 31: Proteinexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu β -Actin; Einfluss von Training entsprechend der Trainingsmodalität

Einfluss von 8 Wochen Ausdauer- bzw. Krafttraining auf die Ruheexpression von LDH-A

Bestimmung in Muskelbiopsien der Ulmer Probanden mittels Western Blot vor Beginn Ausdauertrainingsblockes (0w Ausdauer) und nach 8 Wochen Ausdauertraining (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes; Western Blot je Probe 1x mal durchgeführt; Werte bezogen auf Menge von β -Actin n= 7 Probanden/ Proben je Zeitpunkt (spezifisches Symbol je Proband);

LDH-A =Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Abbildung 31 zeigt, dass die Expression von LDH-A auf Proteinebene während des 8-wöchigen Ausdauertraining bei 5 der 7 untersuchten Probanden sank. Während dem Krafttraining kam es bei 4 Probanden zu einer Zunahme, bei 3 Probanden nahm die Expression ab. Vergleicht man die Werte nach Ende des Ausdauertrainings mit denen nach Ende des Krafttrainings, so sind die Expressionswerte nach Abschluss des Krafttrainings bei 5 der 7 Probanden vergleichsweise höher.

Auf eine Signifikanztestung wurde, bei fehlendem linearem Zusammenhang der Messwerte aufgrund der verwendeten Untersuchungsmethode, verzichtet.

3.3.2 LDH-B Proteinexpression

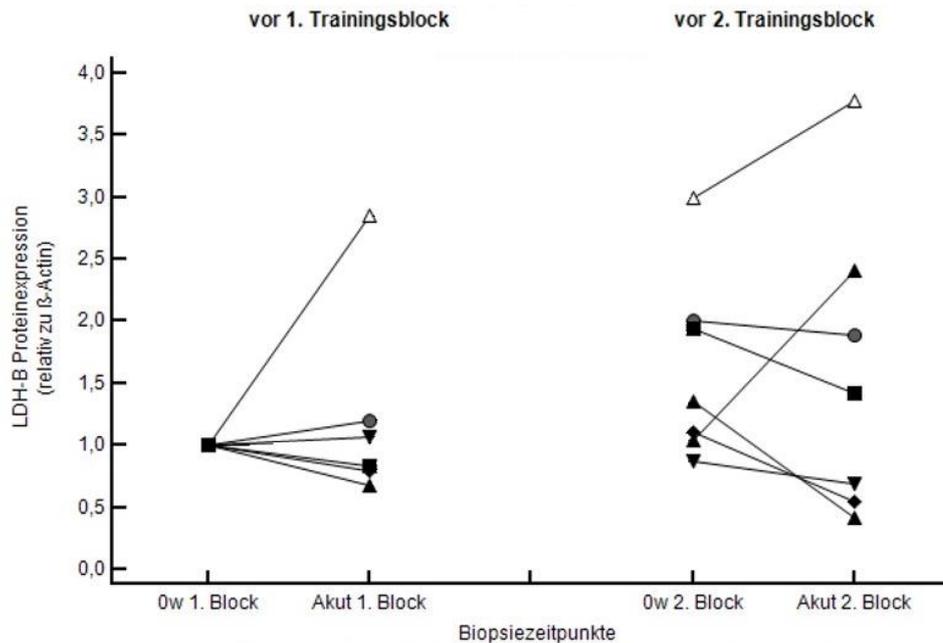


Abbildung 32: Proteinexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss Akutbelastung

Einfluss einer Akutbelastung (Kraftraum und Fahrradergometer) auf die Proteinexpression von LDH-B Bestimmung in Muskelbiopsien der Ulmer Probanden mittels Western Blot vor Beginn des 1. bzw. 2. Trainingsblockes (0w 1. bzw. 2. Block) und nach Akutbelastung (Akut 1. bzw. 2. Block); Western Blot je Probe 1x mal durchgeführt; Werte bezogen auf Menge von β -Actin

n= 7 Probanden/ Proben je Zeitpunkt (bzw. 6 Akut 1. Block) (spezifisches Symbol je Proband);

LDH-A =Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Es zeigt sich eine geringe Beeinflussung der LDH-B Proteinexpression durch die 1. Akutbelastung mit ausgewogener Verteilung zwischen positiven und negativen Veränderungen (**Abbildung 32**). Durch die 2. Akutbelastung kam es, verglichen mit der Ruheexpression, bei 5 der 7 Probanden zu einer Abnahme. Im Vergleich der Expressionen im Ruhezustand vor dem jeweiligen Trainingsbeginn, zeigt sich bei 6 Probanden eine höhere Expression vor Beginn des 2. Trainingsblockes, bei einem Probanden eine vergleichsweise geringe Abnahme der Expression.

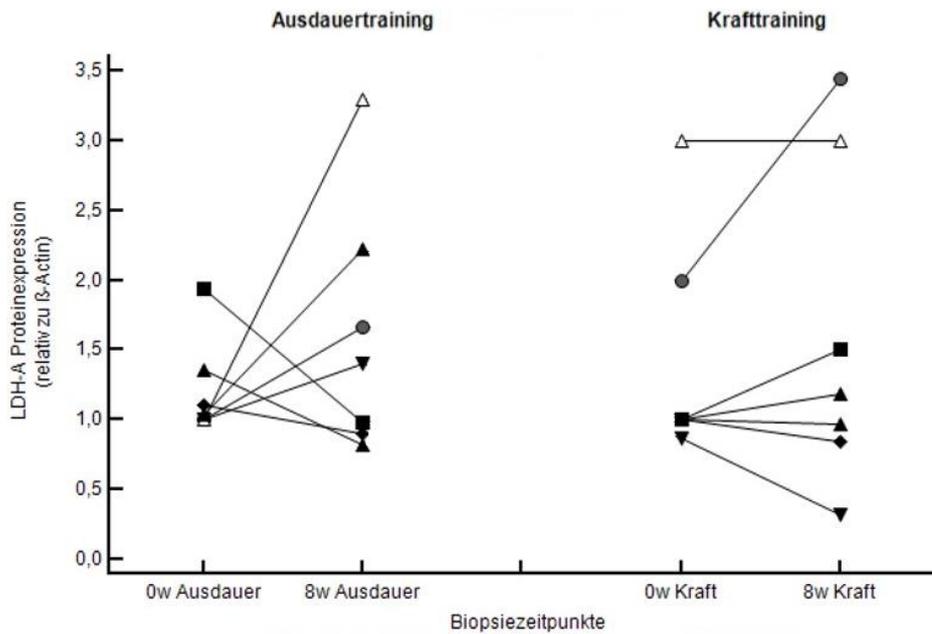


Abbildung 33: Proteinexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss von Training entsprechend der Trainingsmodalität

Einfluss von 8 Wochen Ausdauer- bzw. Krafttraining auf die Ruheexpression von LDH-B

Bestimmung in Muskelbiopsien der Ulmer Probanden mittels Western Blot vor Beginn Ausdauertrainingsblockes

(0w Ausdauer) und nach 8 Wochen Ausdauertraining (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes; Western Blot je Probe 1x mal durchgeführt; Werte bezogen auf Menge von β -Actin

n= 7 Probanden/ Proben je Zeitpunkt (spezifisches Symbol je Proband);

LDH-A =Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse des mittels Western Blot ermittelten Einfluss des 8-wöchigen Ausdauertrainings- bzw. Krafttrainingsprogrammes auf die Proteinexpression von LDH-B. Die Verteilung zwischen Anstieg und Abfall der Expression betrug im Ausdauertrainingsblock 4 zu 3, im Krafttrainingsblock 3 zu 4. Beim Vergleich der Werte am jeweiligen Ende der Trainingsblöcke kommt es ebenfalls zu einer unspezifischen Aufteilung zwischen dem Anstieg bei 3 Probanden vs. Abfall den 4 anderen Probanden. Ein Zusammenhang mit der Trainingsreihenfolge ist nicht zu benennen.

3.3.3 LDH-A/ LDH-B Ratio

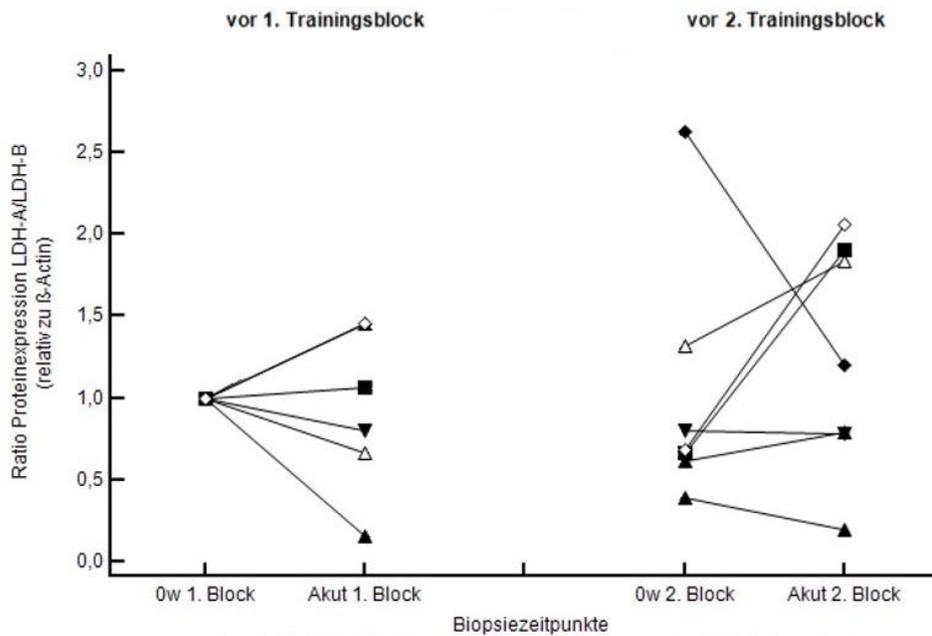


Abbildung 34: Proteinexpressionsanalyse Ratio LDH-A/LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss Akutbelastung

Einfluss einer Akutbelastung (Kraftraum und Fahrradergometer) auf die Proteinexpression Ratio LDH-A/LDH-B Bestimmung in Muskelbiopsien der Ulmer Probanden mittels Western Blot vor Beginn des 1. bzw. 2. Trainingsblockes (0w 1. bzw. 2. Block) und nach Akutbelastung (Akut 1. bzw. 2. Block); Western Blot je Probe 1x mal durchgeführt; Werte bezogen auf Menge von β -Actin

n= 7 Probanden/ Proben je Zeitpunkt (bzw. 6 Akut 1. Block) (spezifisches Symbol je Proband);

LDH-A =Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Eine Abnahme der Proteinratio bei jeweils 3 Probanden in der 1. und 2. Akutbelastung zeigt **Abbildung 34**. Des Weiteren zeigt sich eine geringere Ratio bei 5 der 7 Probanden vor Beginn des 2. Trainingsblockes. Nach der 2. Akutbelastung war die Ratio bei 4 Probanden höher, verglichen mit der Ratio nach der 1. Akutbelastung.

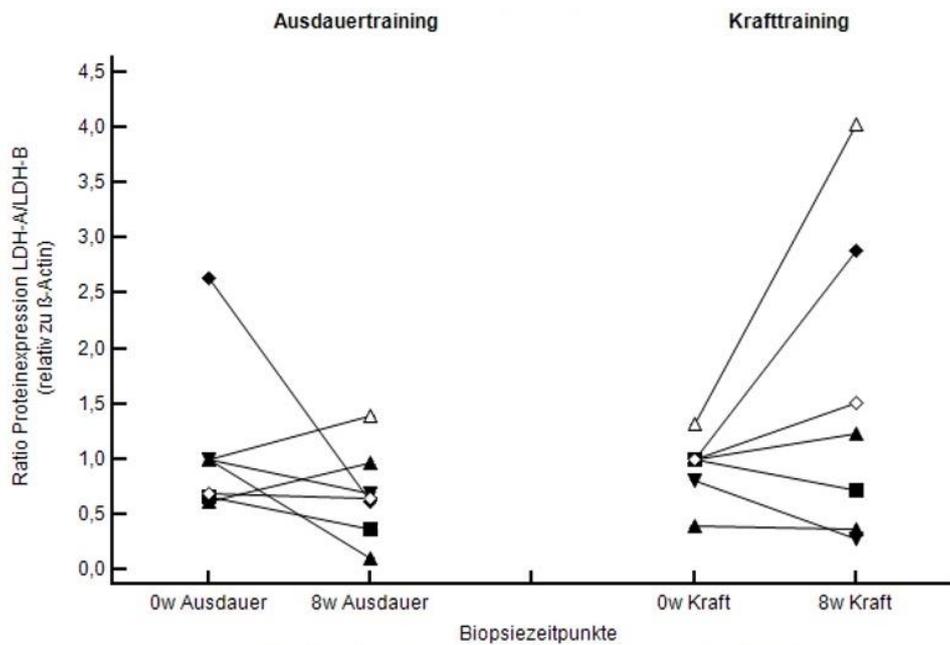


Abbildung 35: Proteinexpressionsanalyse Ratio LDH-A/LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss von Training entsprechend der Trainingsmodalität

Einfluss von 8 Wochen Ausdauer- bzw. Krafttraining auf die LDH-A/LDH-B-Ratio

Bestimmung in Muskelbiopsien der Ulmer Probanden mittels Western Blot vor Beginn Ausdauertrainingsblockes (0w Ausdauer) und nach 8 Wochen Ausdauertraining (8w Ausdauer) und entsprechenden Zeitpunkten des Krafttrainingsblockes; Western Blot je Probe 1x mal durchgeführt; Werte bezogen auf Menge von β -Actin

n= 7 Probanden/ Proben je Zeitpunkt (spezifisches Symbol je Proband);

LDH-A =Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B (Universitätsklinikum Ulm, 2014)

Abnahme der aus den Proteinkonzentrationen gebildeten Ratio durch Ausdauertraining bei 5 der 7 Probanden (**Abbildung 35**). Im Gegensatz hierzu Zunahme der LDH-A/LDH-B-Ratio bei 5 Probanden während des Krafttrainingsblockes. Im Gegensatz hierzu waren die Werte am Ende des Krafttrainings bei 6 Probanden höher als nach dem Ausdauertraining. Die Ausgangswerte vor dem Trainingsbeginn im jeweiligen Trainingsblock waren vor Beginn des Krafttrainings bei 4 Probanden höher, bei 3 Probanden geringer als vor Beginn des Ausdauertrainings.

4 Diskussion

Anhand der aus Studienteil I (nicht Teil dieser Dissertation) gewonnen Erkenntnisse identifizierten wir die Gene LDH-A und LDH-B als mögliche reagible Marker für die Anpassung des menschlichen Körpers an auf ihn einwirkende Trainingsreize. Aufgrund unserer Teilnahme am Studienteil II der multizentrischen BAM-Studie (Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport) standen uns Muskelbiopsien von 21 Probanden zur Verfügung. In diesen Muskelbiopsien bestimmten wir mittels qPCR die Expression der von uns untersuchten Gene zu 8 unterschiedlichen Zeitpunkten des (Ausdauer- bzw. Kraft-) Trainingsprogrammes. Diese 8 untersuchten Zeitpunkte (siehe **Abbildung 5**) waren jeweils vor Beginn des Trainingsblockes, nach einer Akutbelastung vor Beginn des Trainingsblockes, nach 3 Wochen Training und nach 8 Wochen Training, was dem Ende des jeweiligen Trainingsblockes entsprach. Anhand dieser Daten konnten wir Rückschlüsse auf den Einfluss von Ausdauer- bzw. Krafttraining, sowie den Einfluss einer akuten Belastung, auf die Genexpression ziehen. Die interindividuellen Störgrößen konnten wir minimieren, da die Untersuchungen der jeweiligen Veränderungen mit Proben aus ein und demselben Probandenkollektiv durchgeführt wurden.

Aufgrund dem in der Literatur vielfach beschriebenen Zusammenhang von PGC-1 α mit den durch Training ausgelösten Anpassungen in der Skelettmuskulatur, sowie die durch Summermatter et al. 2013 beschriebene essentielle Rolle von PGC-1 α in der Regulation der Laktathomöostase bei Mäusen, untersuchten wir PGC-1 α als weiteres Zielgen.

In einem zweiten Schritt folgte die Analyse auf Proteinebene mittels Western Blot zur Prüfung der Übertragbarkeit der auf Genebene gewonnenen Ergebnisse.

Wir konnten in unseren Untersuchungen nachweisen, dass eine deutliche Expressionserhöhung von PGC-1 α durch die Akutbelastung im Krafraum und auf dem Fahrradergometer ausgelöst wurde. Dies wurde auch in bisherigen Untersuchungen an Mäusen und Menschen bestätigt. Diese Expressionssteigerung passt zu dem vermuteten Mechanismus, über den PGC-1 α ein wichtiger Bestandteil der Anpassungsreaktionen auf Trainingsreize ist. Auch die Ruheexpression konnte durch Ausdauertraining gesteigert werden. Diese gesteigerte Ruheexpression könnte zur Aufrechterhaltung der hervorgerufenen Anpassungsreaktionen, sowie der weiteren Optimierung des Stoffwechsels, dienen. Anschließend an die Detrainingsphase war die PGC-1 α Expression erneut auf das Niveau der Ausgangsruheexpression abgefallen. Im Anschluss an die Detrainingsphase kam es jedoch zu einer geringeren Expressionssteigerung durch die

Akutbelastung. Diese Tatsache könnte darauf hinweisen, dass die Expression weiteren Regulationsmechanismen unterliegt, die von unseren Messungen nicht erfasst wurden. Im Bereich der LDH-Isoformen kam es durch die Akutbelastung ausschließlich zu einer Expressionssteigerung von LDH-A. LDH-B und die LDH-A/LDH-B-Ratio veränderten sich nicht signifikant. LDH-A zeigte zudem eine Expressionssteigerung zu Trainingsbeginn, die unabhängig von der absolvierten Trainingsmodalität war und sich im weiteren Trainingsverlauf verlor. Im Gegensatz hierzu kam es sowohl durch Ausdauer- wie auch Krafttraining zu einer Expressionssteigerung von LDH-B. Diese Expressionssteigerung von LDH-B war beim Ausdauertraining stärker ausgeprägt als beim Krafttraining und wurde auch bereits zu einem früheren Zeitpunkt signifikant. Während des 8-wöchigen Trainingsprogrammes kam es, bei der von uns im Vorfeld als Zielparameter definierten LDH-A/LDH-B-Ratio, ausschließlich im Ausdauertrainingsblock zu einer signifikanten Reduktion. Weder das 8-wöchige Krafttrainingsprogramm noch die Akutbelastung im Krafraum und auf dem Fahrradergometer, führten zu einer signifikanten Beeinflussung.

4.1 PGC-1 α : Expressionssteigerung durch akute Belastung sowie Ausdauertraining

Die erhobenen Daten zeigten eine deutliche und signifikante Erhöhung der PGC-1 α Expression durch die im Krafraum und auf dem Fahrradergometer durchgeführte Akutbelastung (siehe **Abbildung 10**). Bei Differenzierung zwischen der 1. und 2. Akutbelastung wurde weiterhin jeweils eine signifikant erhöhte Expression nach erfolgter Akutbelastung gemessen (siehe **Abbildung 11**). Die Ruhewerte unterschieden sich hierbei vor dem 1. bzw. 2. Trainingsblock nicht signifikant. Im Vergleich der beiden Akutbelastungen war die Expression nach der 2. Akutbelastung signifikant niedriger und die interindividuelle Streubreite zwischen den Probanden nahm ab. Diese veränderte Expressionssteigerung deutet auf eine Adaptation durch den bereits absolvierten Trainingsblock hin.

Unsere Daten belegen somit eine Induktion der PGC-1 α Expression durch akute körperliche Belastung im Krafraum und auf dem Fahrradergometer beim Menschen. Da vor Beginn des Trainingsblockes bei identischer Akutbelastung und erst im Anschluss erfolgtem Training, kein Unterschied in der Steigerung der Expression zu erwarten war, dieser aber gemessen werden konnte, erfolgte die weitere Differenzierung zwischen den

Probanden, welche zuerst den Ausdauerblock und anschließend den Krafttrainingsblock absolvierten (n=15) und den Probanden mit Beginn im Krafttrainingsblock (n=6) (siehe **Abbildung 12**). Ziel dieser Differenzierung war es, eine Verfälschung der Ergebnisse durch ungleiche Gruppengrößen auszuschließen bzw. zu identifizieren. Es zeigte sich unter den Probanden, die mit dem Ausdauerblock begannen, ebenfalls eine signifikante Veränderung zwischen den oben beschriebenen Zeitpunkten. Bei der geringeren Probandenzahl, die mit dem Krafttrainingsblock begonnen hatten, fehlten diese signifikanten Änderungen (bei geringer Probandenzahl und hoher interindividueller Variabilität). In der graphischen Darstellung (**Abbildung 12**) und Analyse der Werte zeigten sich die gleichen Tendenzen.

Daraus schließen wir, dass es **durch eine akute körperliche Belastung zu einer zeitnahen Expressionssteigerung von PGC-1 α** kommt. Diese Steigerung der Expression war in unseren Messungen abhängig vom Trainingsstatus der Muskulatur. Je untrainierter die Muskulatur, desto größer die Expressionssteigerung durch einen identischen Reiz. Unabhängig von der im 1. Trainingsblock absolvierten Trainingsmodalität (Ausdauer- oder Krafttraining) war die Expressionssteigerung durch die Akutbelastung vor Beginn des 2. Trainingsblockes geringer ausgeprägt. Die Expressionen in der ruhenden Muskulatur, vor Beginn des jeweiligen Trainingsblockes, unterschieden sich hierbei nicht signifikant. Hieraus könnte geschlossen werden, dass das bereits absolvierte Training trotz 3-monatiger Detrainingsphase bleibende Veränderungen in der Muskulatur hinterlassen hat, die zu einer geringer ausgeprägten Reaktion auf einen gleichen Reiz führen. Diese Veränderungen spiegeln sich aber nicht in einer bereits in Ruhe erhöhten PGC-1 α Expression wider. Die Ruheexpression von PGC-1 α vor der akuten Belastung unterschied sich nicht.

Vergleicht man die aus den Ruhebiopsien bestimmten PGC-1 α Expressionen zu unterschiedlichen Trainingszeitpunkten, zeigt sich eine Zunahme im Trainingsverlauf. Diese Zunahme war im Ausdauertrainingsblock deutlich ausgeprägter und in der Biopsie nach 8 Wochen Ausdauertraining war sie signifikant (siehe **Abbildung 13**). Zu keiner signifikanten Steigerung kam es im gleichen Zeitraum durch Krafttraining. Bei erneuter getrennter Betrachtung der Probanden entsprechend der Trainingsreihenfolge, war in der Gruppe, welche mit dem Ausdauertraining begonnen hatte, bereits nach 3 Wochen eine signifikante Steigerung messbar (siehe **Abbildung 14**).

Hieraus lässt sich ableiten, dass die **Ruheexpression von PGC-1 α durch Ausdauertraining signifikant gesteigert** wird und im Trainingsverlauf zunimmt.

Die oben beschriebenen Ergebnisse passen zu der in der Literatur vielfach beschriebenen wichtigen Rolle von PGC-1 α in den durch körperliche Aktivität ausgelösten Anpassungsreaktionen im Skelettmuskel. Durch PGC-1 α wurden unter anderem strukturelle Veränderungen wie Angiogenese zur besseren Versorgung mit Sauerstoff (Arany et al. 2008), verbesserte neuromuskuläre Verbindungen (Handschin et al. 2007b), veränderte Fasertypverhältnisse (Li et al. 2002) und Einflüsse auf den Calciumtransport (Summermatter et al. 2012) beschrieben. Über Induktion der Fettoxidation (Summermatter et al. 2011) und der mitochondrialen Biogenese (Lin et al. 2005; Summermatter et al. 2012) verändert es den Muskelmetabolismus.

Um diese positiven Reaktionen auslösen zu können, ist eine Expressionserhöhung (bzw. erhöhte Aktivität) von PGC-1 α die Grundvoraussetzung. Die erhöhte Expression nach Akutbelastung sowie im Trainingsverlauf bestätigt, dass diese Grundvoraussetzung durch körperliche Aktivität beim Menschen ausgelöst werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Expressionssteigerung abhängig vom Trainingsstatus war und die Ruheexpression vor allem durch Ausdauertraining zunahm.

In Übereinstimmung hierzu sind die Daten von Pilegaard et al. 2003, die eine Expressionssteigerung von PGC-1 α gegenüber der Ruheexpression im Anschluss an die durchgeführten Belastung mittels „knee extensor exercise“ beschrieben. Das Expressionsmaximum wurde hier in der Biopsie 2 Stunden nach Belastung gemessen. 24 Stunden nach der Belastung war erneut die Ruheexpression messbar. Im Vorfeld der akuten Belastung hatten die 7 Probanden ein 4-wöchiges Trainingsprogramm mit ausschließlich einem Bein absolviert. In Ruhe bestanden, anschließend an dieses ausschließlich mit einem Bein absolvierte Trainingsprogramm, keine unterschiedlichen Expressionen zwischen den trainierten und untrainierten Beinen. Die Forschungsgruppe ging davon aus, dass das Genexpressionsverhalten im untrainierten Bein, der Expression vor Trainingsbeginn entsprechen würde. Im Vergleich zwischen untrainierter und trainierter Muskulatur, kamen wir, in Hinblick auf den Ruhezustand, zu den gleichen Ergebnissen. Bezogen auf den Einfluss einer akuten Belastung kamen wir zu konträren Beobachtungen. In der zweiten Akutbelastung zeigten unsere Probanden einen geringeren Expressionsanstieg. Bei Pilegaard et al. 2003 wies das zuvor trainierte Bein eine signifikant höhere Expressionssteigerung gegenüber dem untrainierten Bein auf. Die Ursache der unterschiedlichen Beobachtung könnte in den unterschiedlichen Akutbelastungen liegen. Während die Probanden bei Pilegaard et al. 2003 eine (zumindest einem Bein) bekannte Belastung am Ende des Trainingsprogrammes absolvierten, wurde unsere Akutbelastung zu Beginn des jeweiligen Trainingsblockes durchgeführt und

beinhaltete eine Kombination aus Kraft- und Ausdauerbelastung. Ein weiterer Unterschied bestand im Zeitpunkt der Biopsieentnahme 2 Stunden (Pilegaard et al. 2003) vs. 3 Stunden nach Ende der Akutbelastung (in unseren Untersuchungen). Bei Pilegaard et al. 2003 kam es in der nach 6 Stunden entnommenen Biopsie zu einer Entwicklung mit vergleichbarer Tendenz zu unseren Ergebnissen. In der nach 6 Stunden entnommenen Biopsie war PGC-1 α im untrainierten Muskel höher expremiert. Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist, dass Catoire et al. 2012 auch im ruhenden kontralateralen Muskel einen Einfluss auf die Genexpression nachweisen konnten. Mit Wissen über diese systemischen Effekte, ist zwischenzeitlich zu hinterfragen, ob die Expression des kontralateralen Muskels tatsächlich dem Ausgangszustand vor Trainingsbeginn entsprach und somit diesem gleichgesetzt werden durfte.

Eine weitere Studie, die sich unter anderem mit dem Einfluss akuter Belastung und einem 9-tägigen Ausdauertraining auf die Genexpression von PGC-1 α beschäftigte, ist die Studie von Tunstall et al. 2002. Hier konnte erstaunlicherweise keine veränderte Genexpression zwischen den Biopsien vor und nach Training nachgewiesen werden.

Russell et al. 2003 beschäftigte sich ebenfalls mit der Genexpression von PGC-1 α vor und nach einem 6-wöchigen Ausdauer(lauf)training. Zusätzlich wurde die Muskelfasertypzusammensetzung in den Proben untersucht. So konnte eine erhöhte PGC-1 α Expression in Zusammenhang mit einer Erhöhung des Prozentsatzes an MHC Typ I Fasern gestellt werden. Die höchste Ausgangsexpression, wie auch die höchste Expressionssteigerung wurde interessanterweise in MHC Typ IIa Fasern detektiert. MHC Typ IIa und IIx waren am Trainingsende prozentual reduziert. Diese hohe Expressionssteigerung mit Maximum in MHC Typ IIa wurde mittels der Fähigkeit, die mitochondriale Biogenese zu erhöhen, interpretiert (Russell et al. 2003). Unterstützend für diese Hypothese wurden die Ergebnisse von Howald et al. 1985 aufgeführt, die bereits eine Zunahme der Mitochondriendichte ausgelöst durch 6 Wochen Ausdauertraining in allen 3 Muskelfasertypen beobachtet hatten.

In Mäusen war PGC-1 α (zusammen mit Calcineurin) zuvor bereits von Li et al. 2002 eine wichtige Rolle bei der Auslösung von funktionellen Veränderungen in Richtung oxidativer Fasern in Typ II Fasern zugeschrieben worden. Im Unterschied zu Russell et al. 2003 wurde das höchste PGC-1 α nicht in Typ IIa, sondern in Typ I nachgewiesen (Li et al. 2002).

Summermatter et al. 2013 beschrieben eine essenzielle Rolle von PGC-1 α in der Regulation des Laktatstoffwechsels bei Mäusen. Die erhöhte Expression von PGC-1 α durch Belastung in unserem Probandenkollektiv könnte ein Hinweis auf die

Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen sein. In den folgenden Abschnitten wird evaluiert, ob in unserem Probandenkollektiv auch die demzufolge zu erwartende veränderte Genexpression bei LDH-A und LDH-B zu beobachten war.

4.2 LDH-A: Expressionssteigerung durch Akutbelastung und Beginn des Trainings, unabhängig von der Trainingsmodalität

In unseren Untersuchungen steigerte sich die Expression von LDH-A durch die Akutbelastung signifikant (siehe **Abbildung 15**). Interessanterweise kam es bei getrennter Betrachtung der Akutbelastung vor Beginn des 1. und 2. Trainingsblockes ausschließlich bei der 1. Akutbelastung zu einer signifikanten Steigerung (siehe **Abbildung 16**). Durch die identische 2. Akutbelastung nach einer 3-monatigen Detrainingsphase war diese Expressionssteigerung nicht mehr auslösbar. Weiterhin war eine signifikant höhere Expression von LDH-A in Ruhe vor Beginn des 2. Trainingsblockes messbar. Hieraus lässt sich auf einen carry-over Effekt schließen, der unabhängig von der im 1. Block absolvierten Trainingsmodalität ist. Dafür spricht, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wert vor Ausdauertraining und vor Krafttraining gab, wenn die jeweiligen Gruppen die gemischten Trainingsreihenfolgen enthielten (siehe **Abbildung 18**). Allerdings gab es auch keine signifikante Steigerung zwischen jeweils 1. und 2. Ruhewert bei getrennter Betrachtung entsprechend der Trainingsreihenfolge (siehe **Abbildung 19**). Dies ist nur teilweise mittels Anpassungsreaktion erklärbar.

Der Einfluss des Trainings schien unabhängig von der Trainingsmodalität zu sein. Sowohl im Ausdauer- wie auch im Krafttrainingsblock kam es während der ersten 3 Wochen Training zu einer signifikante Expressionssteigerung von LDH-A (siehe **Abbildung 18**). Im weiteren Verlauf dann im Ausdauertrainingsblock zu einer signifikanten Reduktion zwischen dem Wert nach 3 Wochen zum Wert nach 8 Wochen. Bei getrennter Auswertung, entsprechend der unterschiedlichen Trainingsreihenfolge, kam es jeweils in dem zuerst absolvierten Trainingsblock zu einer Expressionssteigerung zu Trainingsbeginn, die im weiteren Verlauf erneut abnahm (siehe **Abbildung 19**). Es ist demnach davon auszugehen, dass die Expressionssteigerungen sowohl in Zusammenhang mit dem „Trainingsalter“ wie auch der Trainingsmodalität standen. Aufgrund des carry-over Effekts zwischen den Trainingsphasen und der daraus resultierenden höheren Ausgangsexpression vor Beginn des 2. Trainingsblockes, fehlte die signifikante Steigerung im 2. Trainingsblock. Hieraus ist abzuleiten, dass die **LDH-A Expression sowohl durch Akutbelastung wie auch durch**

wiederholte (Ausdauer- oder Kraft-)Trainingsreize bei untrainierten Probanden

zunächst gesteigert wird. Diese Steigerung der Ruheexpression war auch nach 3-monatiger Detrainingsphase weiter nachweisbar und bot eine veränderte Ausgangssituation für den folgenden Trainingsblock. Somit ist aufgrund der ungleichen Gruppengrößen zwischen Beginn mit Ausdauertraining (n = 15) vs. Beginn mit dem Krafttrainingsblock (n = 6), sowie der hieraus unterschiedlichen Mischung aus 1. vs. 2. Trainingsblock, eine Interaktion der Ergebnisse bezogen auf die Trainingsmodalität mit dem Zeitpunkt der Durchführung zu beachten.

Diese Ergebnisse entsprechen nicht der vor Versuchsbeginn, anhand des Studienteils I (nicht Teil dieser Dissertation) und der Arbeit von Summermatter et al. 2013 aufgestellten Hypothese, wonach die LDH-A Expression durch Training, insbesondere Ausdauertraining, verringert werden sollte. Grundlage dieser Hypothese war die von Summermatter et al. 2013 beschriebene geringere Expression von LDH-A in Mäusen mit genetisch erhöhter PGC-1 α Expression. Durch diese genetische Veränderung im Bereich von PGC-1 α sollten die durch PGC-1 α vermittelten Anpassungsreaktionen an Training im Skelettmuskel imitiert werden. LDH-A kodiert für die LDH-M-Untereinheit des tetrameren Laktatdehydrogenasekomplexes. Diese M-Untereinheit katalysiert bevorzugt die Reaktion von Pyruvat zu Laktat. Durch eine geringere LDH-A Expression sinkt die Anzahl der für die LDH-Tetramere verfügbaren M-Untereinheiten. Der Anteil von LDH 5 und die Kapazität des Muskelgewebes zur Bildung von Laktat aus Pyruvat sinkt. Hierdurch hatte die erhöhte PGC-1 α Expression in den untersuchten Mäusen über eine Reduktion der LDH-A Expression Einfluss auf die Laktathomöostase. Passend zu den von Summermatter et al. 2013 beschriebenen Veränderungen in den Mäusen mit genetisch imitierter trainierter Muskulatur war in Studienteil I der BAM-Studie die LDH-A Expression in den Muskelproben der trainierten Probanden geringer verglichen mit der der untrainierten Probanden. Somit konnte eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen vermutet werden. Basierend auf diesen Überlegungen hatten wir mit einer Abnahme der LDH-A Expression im Laufe des Trainingsprogrammes gerechnet. In der Auswertung zeigte sich jedoch zunächst eine Zunahme der LDH-A Expression sowohl durch die Akutbelastung wie auch eine Zunahme der Ruheexpression im Trainingsverlauf verglichen mit der Ausgangsruheexpression. Im Laufe des Trainings nahm die Expression im Ausdauertrainingsblock erneut ab, blieb jedoch über der Ausgangsexpression. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen könnte sein, dass wir unsere Untersuchungen mit untrainierten Probanden durchführten. Diese Probandenpopulation wurde gewählt, da hier eine möglichst stark ausgeprägte Reaktion auf den Trainingsreiz zu

erwarten war. Zudem ähnelten sich die Probanden durch diese Wahl in ihrer Ausgangsfitness und Trainingshistorie. Die in Studienteil I untersuchten Ausdauer- und Kraftsportler betrieben ihre jeweilige Sportart bereits über einen längeren Zeitraum. Somit könnte den unterschiedlichen Beobachtungen eine differenzierte Veränderung der Genexpression entsprechend des Trainingsalters zugrunde liegen. Hierfür spricht die zunächst beobachtete Expressionssteigerung, gefolgt von einer Abnahme der LDH-A Genexpression im weiteren Trainingsverlauf. Darüber hinaus konnte bei genauer Betrachtung unsere Ergebnisse in der Gruppe, welche den Ausdauerblock anschließend an den Krafttrainingsblock absolvierte, eine tendenzielle Abnahme (unter die Ausgangsexpression) beobachtet werden. Diese blieb, wahrscheinlich aufgrund der geringen Probandenzahl in dieser Gruppe (n=6), jedoch ohne Signifikanz. Durch den carry-over Effekt aus dem 1. Trainingsblock (Krafttraining), hatten die Probanden zu Beginn des Ausdauertrainings bereits eine bessere Ausgangsfitness. Es könnte somit aus den Daten geschlossen werden, dass es sowohl durch eine akute Belastung wie auch durch Training beim Untrainierten zunächst zu einer Expressionssteigerung kommt und erst ab Erreichen einer gewissen Grundfitness wieder zur bisher durch Summermatter et al. 2013 und Studienteil I beschriebenen Abnahme der Expression.

Bei Untersuchungen an muskelspezifischen PGC-1 α knock-out Mäusen konnten Handschin et al. 2007a eine Reduktion der LDH-A Expression messen. Somit stehen diese Ergebnisse ebenfalls im Gegensatz zu der von Summermatter et al. 2013 beschriebenen Reduktion der LDH-A Expression durch Überexpression von PGC-1 α in Mäusen. Die muskelspezifischen PGC-1 α knock-out Mäusen zeigten in den durchgeführten Untersuchungen eine reduzierte freiwillige Aktivität und Maximalkraft, sowie eine geringere Ausdauerleistungsfähigkeit (Handschin et al. 2007a; Handschin et al. 2007b). Aufgrund des anderweitigen Fokus der Arbeit, wurde die LDH-A Expression nicht aus Muskelproben nach Belastung oder Training bestimmt, bzw. diese Ergebnisse nicht im Paper veröffentlicht.

In Zusammenschau der oben aufgeführten Ergebnisse ist nicht abschließen zu klären, in wieweit ein unipolarer Zusammenhang zwischen PGC-1 α Expression/ Ausdauerleistungsfähigkeit und LDH-A Expression besteht. Eine neue und mit weiteren Untersuchungen zu überprüfende Hypothese ist, dass die LDH-A Expression beim zuvor vollkommen untrainierten Organismus durch Training zunächst ansteigt und nach Erreichen einer gewissen Grundfitness durch weiteres Training und somit zunehmender Leistungsfähigkeit erneut abnimmt. Des Weiteren ist der molekulare Mechanismus der Wirkung von PGC-1 α auf die LDH-A Expression bisher nicht bekannt. Eine Interaktion

durch weitere Faktoren mit Einfluss auf die LDH-A Expression ist hiermit ebenfalls möglich.

4.3 LDH-B: ausgeprägtere Expressionssteigerung durch Ausdauertraining verglichen mit Krafttraining

Im Gegensatz zu LDH-A war die Expression von LDH-B nicht durch eine akute Belastung beeinflussbar (siehe **Abbildung 20**).

Während des absolvierten Trainingsprogrammes war, sowohl durch Ausdauer- wie auch Krafttraining, eine signifikante Steigerung der LDH-B Expression im Trainingsverlauf messbar (siehe **Abbildung 23**). Während die Steigerung im Krafttrainingsblock erst nach 8 Wochen Training signifikant wurde, war im Ausdauertrainingsblock bereits nach 3 Wochen eine signifikante Steigerung messbar, die bis zum Ende des 8-wöchigen Ausdauertrainingsprogrammes sogar hochsignifikant wurde. Aufgrund des zwischen den Ruhewerten vor dem 1. und 2. Trainingsblock bestehendem signifikanten Unterschied mit höherer Expression vor Beginn des 2. Trainingsblockes (siehe **Abbildung 21**), erfolgte eine getrennte Auswertung entsprechend der Trainingsreihenfolge (siehe **Abbildung 24**). Hier fehlte, a.e. bei bereits vor Trainingsbeginn durch den carry-over Effekt des vorausgegangenen Ausdauerblockes erhöhter Expression von LDH-B, die signifikante Steigerung innerhalb des Krafttrainingsblockes. Daraus könnte geschlossen werden, dass die durch Krafttraining ausgelöste geringere Expressionssteigerung nur bei zuvor untrainierten Probanden und dementsprechend geringer Ausgangsexpression zu einer signifikanten Änderung innerhalb des 8-wöchigen Trainingsprogrammes führte.

Die beobachtete Expressionssteigerung von LDH-B durch Ausdauertraining passt zu den Ergebnissen von Stepto et al. 2009. Im Rahmen der Analyse der Auswirkungen von langjährig ausgeübtem Training auf das Genexpressionsmuster im Muskel identifizierten Stepto et al. 2009 LDH-B als eines der drei Gene (neben MDH1 und SLC16A7), die bei Ausdauersportlern höher exprimiert waren. Ausdauersportler, welche über viele Jahre regelmäßiges Ausdauertraining betrieben hatten, besaßen im Vergleich mit Kraftsportlern oder Untrainierten, eine signifikant höhere Expression von LDH-B. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen wurden hierbei nicht die Expressionen der einzelnen Proben ermittelt, sondern ein Homogenat der 6-7 Proben je Gruppe angefertigt und in diesem die relative Expression mittels PCR bestimmt. Ob der ebenfalls beschriebene Unterschied zwischen Ausdauer- und Kraftsportlern, welcher innerhalb unseres Probandenkollektives nach 8

Wochen Training noch nicht signifikant war, auf dem langjährigen Trainings oder auf interindividuellen Veranlagungen basierte, ist nicht zu sagen. Eine Beobachtung über einen noch längeren Trainingszeitraum könnte darüber Aufschluss bieten, ob LDH-B in den jeweiligen Gruppen weiterhin unterschiedlich stark steigt, ob es ab einem bestimmten Trainingslevel zu einer Plateaubildung kommt und wie sich die Differenz in den Expressionssteigerungen der LDH-B zwischen den beiden Trainingsformen entwickelt. Die durch das Trainingsprogramm ausgelösten Veränderungen im Bereich der LDH-B Expression stimmen mit der vor Studienbeginn aufgestellten Hypothese überein. Basierend auf den Ergebnissen von Summermatter et al. 2013 und den Ergebnissen aus Studienteil I der BAM-Studie (nicht Teil dieser Dissertation) stellten wir die Hypothese auf, dass die LDH-B Expression durch Training beeinflusst und gesteigert werden kann. Diese Steigerung sollte durch Ausdauertraining ausgeprägter sein wie durch Krafttraining. Mäuse, die eine muskelspezifische Überexpression von PGC-1 α besaßen, hatten im Vergleich mit Wildtypmäusen eine höhere Expression von LDH-B (Summermatter et al. 2013). Zudem wiesen sie eine höhere Ausdauerleistungsfähigkeit und ein besseres Laktathandling auf. In Studienteil I konnte in der ausdauertrainierten Muskulatur im Vergleich zur untrainierten Muskulatur ebenfalls eine höhere LDH-B Expression gemessen werden.

4.4 LDH-A/LDH-B-Ratio: vielversprechender Marker für Ausdauertrainingszustand?

In den durchgeführten Untersuchungen blieb die Ratio der Expression von LDH-A zu LDH-B unbeeinflusst durch die Akutbelastung im Krafttraum und auf dem Fahrradergometer (siehe **Abbildung 25**). Durch das Ausdauertraining kam es zu einer hochsignifikanten Reduktion der Ratio über den gesamten Trainingsverlauf (siehe **Abbildung 28**). Zusätzlich kam es zu einer signifikanten Reduktion zwischen Woche 3 und 8 des Ausdauertrainings. Während des Krafttrainingsblockes kam es zu keiner signifikanten Reduktion. Auch bei der Ruheratio bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten vor Beginn des 1. und 2. Trainingsblockes (siehe **Abbildung 26**). Somit war auch hier ein carry-over Effekt über die Detrainingsphase hinaus vorhanden. Um eine Ergebnisverfälschung zu verhindern und den Einfluss von carry-over Effekt und der größeren Anzahl an Probanden mit Beginn im Ausdauerblock zu beurteilen, erfolgte auch hier die getrennte Auswertung entsprechend der Trainingsreihenfolge (siehe

Abbildung 29). Hierbei zeigte sich in der größeren Gruppe (n = 15) mit der Reihenfolge Ausdauer- und anschließend Krafttraining wiederum eine hochsignifikante Reduktion durch 8 Wochen Ausdauertraining. In der Gruppe, die mit dem Krafttrainingsblock begonnen hatten (n = 6), waren keine signifikanten Unterschiede messbar. Die LDH-A/LDH-B-Ratio war bei unseren Werten somit spezifisch für die Veränderung der Genexpression im Bereich der LDH-Gene, die durch längerfristiges Ausdauertraining hervorgerufen wurde. Es kam zu keiner Interaktion durch akute Belastung. Auch Krafttraining hatte in dem von uns beobachteten Zeitraum keinen relevanten Einfluss auf die Ratio. Die in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Expressionsveränderungen im Bereich der LDH-Gene zeigten eine vergleichsweise höhere Beeinflussbarkeit von LDH-B durch Ausdauertraining. Obwohl es bei LDH-A zu einer weniger eindeutigen Veränderung kam, war die Ratio aus LDH-A und LDH-B spezifischer für die durch Ausdauertraining ausgelösten Veränderungen auf Genexpressionsebene als die LDH-B Expression alleine.

4.5 Zusammenhang Fasertyp und LDH-Isoenzymvorkommen

Bereits 1964 veröffentlichten van Wijhe et al. 1964 eine Arbeit, in der sie den von ihnen beobachteten Zusammenhang zwischen der LDH-Isoenzymzusammensetzung und den unterschiedlichen menschlichen Muskeltypen beschrieben. In roten, aerob orientierten Muskeln fanden sie alle 5 LDH-Isoenzyme, jedoch vorwiegend Isoenzym I, II und III. Die Isoenzyme IV und V waren hingegen in den weißen, anaeroben arbeitenden Muskeln vorhanden. Sie empfanden diese Verteilung als logisch und sinnvoll in Bezug auf die unterschiedlichen Stoffwechseleigenschaften der beschriebenen Muskeln. Leberer und Pette 1984 stellten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen den Fasertypen und dem LDH-Isoenzymvorkommen in Hasenmuskeln her. Sie lehnten im Weiteren allerdings einen Zusammenhang zwischen der aeroben Kapazität und dem Vorkommen der H-Untereinheit ab, weil sie in Typ IIa und IIb Fasern jeweils eine ähnliche Mischung aus LDH 3-5 bestimmten, die Fasern aber hohe bzw. niedrige aerobe Kapazitäten aufwiesen. Die Veränderungen in der LDH-Isoenzymverteilung bei bereits trainierten Marathonläufern durch weiteres Training auf einen Wettkampf wurden von Apple und Rogers 1986 untersucht. Sie kamen zu dem Schluss, dass das LDH-Typ Vorkommen zwar abhängig vom Fasertyp ist, es aber auch zu einer Verschiebung der Isoenzymverteilung ohne Änderung des Fasertyps kommen kann. Dies wurde durch die am Ende der Trainingsperiode erhöhte

LDH 1 Aktivität ohne Veränderungen in der Fasertypverteilung belegt. Interessanterweise kam es insgesamt zu einer Abnahme der totalen LDH Aktivität. Eine positive Korrelation zwischen der Menge an LDH-A und Typ II Fasern sowie LDH-B mRNA und Typ I Fasern konnte von Plomgaard et al. 2006 in menschlichen Muskelproben detektiert werden.

4.6 Proteinexpression

Die mittels Western Blot analysierten Proteinexpressionsveränderungen sind aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft des Western Blots als Analysemethode, nicht mittels statistischer Analysen zu evaluieren und können lediglich als Abbild ggf. vorhandener Tendenzen gewertet werden. Dennoch entschieden wir uns aufgrund der weiten Verbreitung des Western Blot in der wissenschaftlichen Welt, zur Durchführung gefolgt von einer möglichst effizienten Auswertung. Aussagekräftig waren die Ergebnisse im Bereich der LDH-B Proteinexpression vor Beginn des 1. und 2. Trainingsblockes. Es kam bei allen untersuchten Probanden (bis auf einen) zu einem Anstieg der LDH-B Proteinexpression zwischen Beginn des 1. und 2. Trainingsblockes. Bei dem Probanden, mit geringerer Expression vor Beginn des 2. Trainingsblockes, war dieser Unterschied vergleichsweise gering ausgeprägt und kann ggf. auch im Rahmen der eingeschränkten Messgenauigkeit entstanden sein. Somit war deutlich zu sehen, dass auch noch nach 3-monatiger Detrainingsphase eine erhöhte LDH-B Proteinexpression vorhanden zu sein scheint. Dies entspricht den Beobachtungen auf Ebene der Genexpression. Hier war die LDH-B Expression vor Beginn des 2. Trainingsblockes ebenfalls signifikant höher wie vor Beginn des 1. Trainingsblockes.

Eine weitere Beobachtung konnte im Bereich der Proteinratio von LDH-A zu LDH-B gemacht werden. Die Ratio am Ende des Ausdauertrainingsblockes war bei 6 der 7 Probanden niedriger, wie am Ende des Krafttrainingsblockes. Des Weiteren reduzierte sich die Ratio während des Ausdauertrainings bei 5 Probanden. Auch hier passten die Veränderungen auf Proteinebene zu denen auf Ebene der Genexpression. Auf Genexpressionseben war die LDH-A/LDH-B-Ratio spezifisch für die durch Ausdauertraining hervorgerufenen Veränderungen. Bei vorwiegend geringerer Ratio am Ende des Ausdauertrainingsblockes gegenüber dem Ende des Krafttrainingsblockes, sowie Abnahme der Ratio ausschließlich während des Ausdauertrainingsblockes ist eine entsprechende Veränderung auch auf Proteinebene anzunehmen.

4.7 Antworten auf die ursprüngliche Fragestellung

Wie beeinflusst Ausdauertraining bzw. Krafttraining die LDH-A/LDH-B-Ratio im Muskel?

Auf Grundlage der vorgestellten Studie ist anzunehmen, dass sich durch Ausdauertraining die LDH-A/LDH-B-Ratio im Muskel verringert. Eine entsprechende Tendenz ist durch Krafttraining ebenfalls zu beobachten, es kam innerhalb eines 8-wöchigen Trainingsprogrammes aber zu keiner signifikanten Veränderung. Ob diese durch längerfristiges Krafttraining zustande kommen würde, sollte mittels weiterer Untersuchungen evaluiert werden.

Unterscheiden sich die durch Ausdauertraining bewirkten Veränderungen, von denen die durch Krafttraining erreicht werden?

In Bezug auf die Veränderungen im Bereich der LDH-A und LDH-B mRNA Expression ist dies mit ja zu beantworten. Während LDH-A vor allem auf ungewohnte (Kraft- und Ausdauer-) Trainingsreize mit einer Expressionserhöhung zu reagieren scheint, kommt es bei der LDH-B Expression zu einer deutlich höheren Anpassungsreaktion auf Ausdauertraining, aber nicht zu einer Veränderung der Expression auf einen akuten Reiz.

Kann die LDH-A/LDH-B-Ratio als Marker für die Ausdauerleistungsfähigkeit gesehen werden?

In den erhobenen Daten zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Zunahme der Ausdauerleistungsfähigkeit und Abnahme der LDH-A/LDH-B-Ratio. Eine Beeinflussung durch akute Belastung oder Krafttraining zeigte sich nicht. Somit erfüllt die LDH-A/LDH-B-Ratio die Grundvoraussetzungen um als Trainingsmarker für die Ausdauerleistungsfähigkeit genutzt werden zu können. Wie sich die Ratio unter längerfristigem Training entwickelt, ob sie beispielsweise ab einem gewissen Leistungsniveau ein Plateau erreicht, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Überblick und schematische Darstellung dieser Ergebnisse im Anhang 8.3, Seite 92.

4.8 Limitationen

Durch die ungleiche Gruppengröße zwischen Beginn mit Ausdauer- und Krafttraining (ursprünglich im Studiendesign anders vorgesehen bzw. geplant, jedoch nicht konsequent an allen Studienorten umgesetzt) gingen wichtige Informationen über den Einfluss der Trainingsreihenfolge verloren. Dies dürfte die Hauptlimitation unserer Untersuchungen sein. Hierdurch gingen wichtige Informationen über den Einfluss der Trainingsreihenfolge verloren, da oftmals nicht gesagt werden konnte, ob die analysierten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ihre Ursache in der Abfolge der Trainingsmodalitäten oder in der unterschiedlichen Gruppengröße hatten. Abgesehen hiervon konnte auf die Ergebnisse einer ausreichend großen Probandenzahl zurückgegriffen werden, die im Vergleich zu ähnlichen Studien höher ist.

Eine weitere Einschränkung resultiert aus der aufgrund der von uns erhobenen Daten (zumindest auf Eben der Genexpression) als falsch einzuschätzenden Annahme, dass anschließend an eine 3-monatige Detrainingsphase erneut der Ausgangszustand erreicht sein würde. Dies beinhaltet andererseits aber auch eine neue Erkenntnis über die Dauer der durch Trainingsreize ausgelösten Veränderungen auf Genexpressionseben im Bereich der untersuchten Zielgene. Trotzdem wäre eine erneute Spiroergometrie und Maximalkraftbestimmung vor Beginn des 2. Trainingsblockes wünschenswert gewesen. Diese erneute Bestimmung der Leistungsfähigkeit wurde nicht durchgeführt, da aufgrund der bisher in diesem Bereich verfügbaren Daten, davon ausgegangen wurde, dass durch die 3-monatige Detrainingsphase der untrainierte Ausgangszustand erneut erreicht sein würde. Mit dieser erneuten Bestimmung der Leistungsfähigkeit, hätte die Möglichkeit bestanden, eine Verknüpfung des carry-over Effekts auf Ebene der Genexpression mit der Leistungsfähigkeit, herzustellen.

4.9 Ausblick

Zur Evaluation der Entwicklung der Genexpression bei längerfristiger Exposition gegenüber den Reizen eines Ausdauer- oder Krafttrainings und die Entwicklung im Bereich höherer Leistungsfähigkeit, wäre eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum wünschenswert. Da der Zeitraum mit 7 Monaten (2 x 8 Wochen Training plus 3 Monate Detrainingsphase) für die Probanden bereits bei unserer Studie relativ lang war, wird es nur schwer möglich sein, ausreichend Probanden für eine entsprechende Studie zu akquirieren

und bis zum Ende der Untersuchung eine ausreichende Motivation sicher zu stellen. Eine Alternative wäre die Untersuchung an bereits (mäßig) trainierten Probanden, um somit ein höheres Einstiegsniveau zu erlangen. Es könnten auch die Veränderungen innerhalb einer Trainingsaison durch Analyse von Muskelproben vor Beginn bzw. am Ende des Trainingszeitraumes untersucht werden.

Eine weitere Spezifizierung der Ergebnisse könnte durch die zusätzliche Bestimmung der LDH-Isoenzymaktivität erreicht werden. Zusätzlich könnte durch Bestimmung der LDH-Komplexzusammensetzung eine Verbindung zwischen Genexpression und Isoenzymzusammensetzung bewiesen werden.

Abseits der Sportmedizin wird der LDH auch im Tumorstoffwechsel eine essenzielle Rolle zugeschrieben. Auf diesem Hintergrund untersuchte die Forschungsgruppe um Aveseh et al. 2015 den Einfluss von Ausdauertraining auf die Expression von LDH-A und LDH-B in Brustkrebszellen bei Mäusen. Sie konnten zeigen, dass es durch Ausdauertraining zu einer Abnahme der LDH-A Expression in den Tumorzellen kam, die LDH-B Expression stieg. Dies führte zu einem Shift Richtung LDH-1 im Bereich der LDH-Isoenzyme, sowie einer geringeren Laktatkonzentration im Tumorgewebe der trainierten Mäuse. Die Tumore bei den Mäusen der Ausdauertrainingsgruppe waren zudem kleiner und leichter als die der Kontrolltiere. Somit könnte die Studie ein Hinweis auf einen positiven Effekt von Ausdauertraining bei Brustkrebspatienten darstellen.

5 Zusammenfassung

Die Laktathomöostase hat einen hohen Stellenwert im Spitzen- und Breitensport, unter anderem aufgrund der weit verbreiteten Laktat-Leistungsdiagnostik. Die Regulation der Laktathomöostase, sowie die durch Training verursachten Veränderungen, sind jedoch auf molekularer Ebene bisher nur unzureichend untersucht. Das maßgeblich am Laktatstoffwechsel beteiligte Enzym ist die Laktatdehydrogenase (LDH). Die verschiedenen Isoformen des tetrameren LDH-Komplexes unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung der verfügbaren Untereinheiten. Untereinheit M (muscle subunit) katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat, Untereinheit H (heart subunit) die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Entsprechend ihrer Zusammensetzung katalysiert die LDH somit vorzugsweise den Aufbau bzw. Abbau von Laktat. Auf mRNA-Ebene (messenger ribonucleid acid) wird die M-Untereinheit durch das LDH-A Gen kodiert, die H-Untereinheit durch das LDH-B Gen.

In Studien an Mäusen, bei denen durch muskelspezifische Überexpression von PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) ein ausdauertrainierter Phänotyp imitiert wurde, konnte gezeigt werden, dass sich die LDH-A (Laktatdehydrogenase-A) Expression gegenüber Wildtypmäusen verringerte und die LDH-B (Laktatdehydrogenase-B) Expression steigerte und so die Laktathomöostase beeinflusst wird. Ergänzend hierzu konnten wir auf die Ergebnisse der Querschnittsstudie, Studienteil I der BAM-Studie (Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport), zugreifen, die eine höhere Expression von LDH-A bei untrainierten Probanden sowie im Vergleich eine höhere LDH-B bei ausdauertrainierten jungen männlichen Probanden fand. Diese Ergebnisse dienten als Grundlage zur Generierung der bearbeiteten Hypothese: Auch beim Menschen steigt durch regelmäßiges Ausdauertraining die PGC-1 α Expression, was zu einer Reduktion von LDH-A und Steigerung der LDH-B Expression in der Skelettmuskulatur führt und somit zu einer Abnahme der LDH-A/LDH-B-Ratio. Diese Veränderung ist durch Krafttraining nicht auslösbar, sodass eine verringerte LDH-A/LDH-B-Ratio ein Trainingsmarker für ausdauertrainierte Muskulatur ist. Mittels unserer Cross-over-Trainingsstudie, Studienteil II der BAM-Studie, wurde der Einfluss von Ausdauer- bzw. Krafttraining, sowie einer akuten Belastung im Kraftraum und auf dem Fahrradergometer auf die PGC-1 α , LDH-A und LDH-B Expression im Muskelgewebe untersucht. Die Probanden absolvierten ein 8-wöchiges Ausdauer- oder Krafttraining, gefolgt von einer 3-monatigen Pause und einer zweiten Trainingsphase in der bisher noch nicht trainierten Trainingsmodalität. Vor Trainingsbeginn, nach erfolgter

Akutbelastung, nach 3 Wochen Training und am Ende des Trainingsprogrammes wurden Muskelbiopsien entnommen. In diesen Muskelproben wurde mittels qPCR (quantitative real-time Polymerasekettenreaktion) die Menge an PGC-1 α , LDH-A und LDH-B bestimmt. Durch die Akutbelastung kam es zu einer Expressionssteigerung von PGC-1 α . Die PGC-1 α Ruheexpression wurde, im Gegensatz zum Krafttraining, durch Ausdauertraining signifikant gesteigert und nahm im weiteren Trainingsverlauf weiter zu. Die LDH-A Expression wurde durch sämtliche Trainingsreize bei den untrainierten Probanden zunächst gesteigert. LDH-B war nicht durch eine akute Belastung beeinflussbar. Im Trainingsverlauf erhöhte sich die LDH-B Expression durch Ausdauer- wie auch Krafttraining signifikant, ausgeprägter jedoch durch Ausdauertraining. Die von uns vor Studienbeginn als Zielparameter definierte LDH-A/LDH-B-Ratio war spezifisch für die durch Ausdauertraining ausgelösten Veränderungen der LDH Gene im Skelettmuskel. Es kam zu einer hochsignifikanten Reduktion der Ratio während der Ausdauertrainingsphase. Durch Krafttraining oder eine akute Belastung wurde die Ratio nicht beeinflusst. Mittels Western Blot konnten wir auch auf Proteinebene eine Zunahme des LDH-B Proteins nach Absolvierung des ersten Trainingsblockes nachweisen. Die Proteinratio von LDH-A zu LDH-B reduzierte sich durch das Ausdauertraining bei der Mehrzahl der Probanden und war am Ende des Ausdauerblockes meist geringer als zum Ende des Krafttrainingsblockes. Zusammenfassend konnte durch unsere Untersuchungen gezeigt werden, dass eine akute körperliche Belastung Einfluss auf die Genexpression von PGC-1 α und LDH-A, nicht jedoch auf LDH-B hat. Im Bereich der Ruheexpression führte lediglich Ausdauertraining zu einer Expressionssteigerung von PGC-1 α . LDH-A steigerte sich durch beide Trainingsmodalitäten zunächst, LDH-B wurde durch Ausdauertraining ausgeprägter gesteigert als mittels Krafttraining. Am spezifischsten für die durch Ausdauertraining ausgelösten Veränderungen im Skelettmuskel war die Ratio der Expression von LDH-A zu LDH-B. Diese nahm im Trainingsverlauf ab, durch eine akute Belastung wurde sie nicht beeinflusst. Dieser Zusammenhang zwischen Zunahme der Ausdauerleistungsfähigkeit und Abnahme der LDH-A/LDH-B-Ratio bildet die Grundvoraussetzung um die Ratio als Marker für die Trainingssteuerung nutzen zu können. Zur Klärung des genaueren Zusammenhanges und Evaluation, ob es ab einem bestimmten Leistungsniveau zu einer Plateaubildung kommt, sind weitere Untersuchungen notwendig. Einen anderen interessanten Ansatz zur Nutzung der oben beschriebenen Erkenntnisse bilden neue Forschungsergebnisse, die eine Relevanz der LDH im Tumorstoffwechsel beschreiben und zukünftig die Bedeutung der Laktathomöostase in der Medizin auch außerhalb der Sportmedizin und Trainingssteuerung erhöhen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Apple, FS; Rogers, MA (1986): Skeletal muscle lactate dehydrogenase isozyme alterations in men and women marathon runners. *Journal of applied physiology* 61, 477–481
2. Arany, Z; Foo, S-Y; Ma, Y; Ruas, JL; Bommi-Reddy, A; Girnun, G; Cooper, M; Laznik, D; Chinsomboon, J; Rangwala, SM; Baek, KH; Rosenzweig, A; Spiegelman, BM (2008): HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 451, 1008–1012
3. Aveseh, M; Nikooie, R; Aminaie, M (2015): Exercise-induced changes in tumour LDH-B and MCT1 expression are modulated by oestrogen-related receptor alpha in breast cancer-bearing BALB/c mice. *The Journal of Physiology* 593, 2635–2648
4. Bárány, M (1967): ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *The Journal of general physiology* 50, 197-218
5. Bodine, SC (2013): Disuse-induced muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2200–2208
6. Bouchard, C; An, P; Rice, T; Skinner, JS; Wilmore, JH; Gagnon, J; Pérusse, L; Leon, AS; Rao, DC (1999): Familial aggregation of VO₂max response to exercise training. Results from the HERITAGE Family Study. *Journal of applied physiology* 87, 1003–1008
7. Buser, K; Kopp, B; Gehr, P; Weibel, E; Hoppeler, H (1982): Effect of cold environment on skeletal muscle mitochondria in growing rats. *Cell and tissue research* 225, 427–436
8. Cairns, SP (2006): Lactic acid and exercise performance. Culprit or friend? *Sports medicine* 36, 279–291
9. Calvo, JA; Daniels, TG; Wang, X; Paul, A; Lin, J; Spiegelman, BM; Stevenson, SC; Rangwala, SM (2008): Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *Journal of applied physiology* 104, 1304–1312
10. Catoire, M; Mensink, M; Boekschoten, MV; Hangelbroek, R; Müller, 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, 51066
11. Dawson, DM; Goodfriend, TL; Kaplan, NO (1964): Lactic dehydrogenases. Functions of the two types rates of synthesis of the two major forms can be correlated with metabolic differentiation. *Science* 143, 929–933
12. Desplanches, D (1997): Structural and functional adaptations of skeletal muscle to weightlessness. *International Journal of Sports Medicine* 18 Suppl 4, 259-264
13. Handschin, C; Chin, S; Li, P; Liu, F; Maratos-Flier, E; Lebrasseur, NK; Yan, Z; Spiegelman, BM (2007a): Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knock-out animals. *The Journal of biological chemistry* 282, 30014–30021
14. Handschin, C; Kobayashi, YM; Chin, S; Seale, P; Campbell, KP; Spiegelman, BM (2007b): PGC-1 α regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes & development* 21, 770–783

15. Henriksson, J; Reitman, J (1977): Time course of changes in human skeletal muscle succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities and maximal oxygen uptake with physical activity and inactivity. *Acta physiologica Scandinavica* 99, 91-97
16. Hoppeler, H (1986): Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine* 7, 187–204
17. Hoppeler, H; Klossner, S; Vogt, M (2008): Training in hypoxia and its effects on skeletal muscle tissue. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 18, 38–49
18. Howald, H; Hoppeler, H; Claassen, H; Mathieu, O; Straub, R (1985): Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 403, 369–376
19. Leberer, E; Pette, D (1984): Lactate dehydrogenase isozymes in type I, IIA and IIB fibres of rabbit skeletal muscles. *Histochemistry* 80, 295–298
20. Li, J; Kinoshita, T; Pandey, S; Ng, CK-Y; Gygi, SP; Shimazaki, K-i; Assmann, SM (2002): Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 418, 793–797
21. Lin, J; Handschin, C; Spiegelman, BM (2005): Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism* 1, 361–370
22. Livak, KJ; Schmittgen, TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408
23. Mahoney, DJ; Carey, K; Fu, M-H; Snow, R; Cameron-Smith, D; Parise, G; Tarnopolsky, MA (2004): Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiological genomics* 18, 226–231
24. Mahoney, DJ; Parise, G; Melov, S; Safdar, A; Tarnopolsky, MA (2005): Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1498–1500
25. Neubauer, O; Sabapathy, S; Ashton, KJ; Desbrow, B; Peake, JM; Lazarus, R; Wessner, B; Cameron-Smith, D; Wagner, K-H; Haseler, LJ; Bulmer, AC (2014): Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. *Journal of applied physiology* 116, 274–287
26. Pette, D; Staron, RS (1990): Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 116, 1–76
27. Pilegaard, H; Saltin, B; Neufer, PD (2003): Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 546, 851–858
28. Plomgaard, P; Penkowa, M; Leick, L; Pedersen, BK; Saltin, B; Pilegaard, H (2006): The mRNA expression profile of metabolic genes relative to MHC isoform pattern in human skeletal muscles. *Journal of applied physiology* 101, 817–825
29. Russell, AP; Feilchenfeldt, J; Schreiber, S; Praz, M; Crettenand, A; Gobelet, C; Meier, CA; Bell, DR; Kralli, A; Giacobino, J-P; Dériaz, O (2003): Endurance

- training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 52, 2874–2881
30. Stepto, NK; Coffey, VG; Carey, AL; Ponnampalam, AP; Canny, BJ; Powell, D; Hawley, JA (2009): Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. *Medicine and science in sports and exercise* 41, 546–565
 31. Summermatter, S; Santos, G; Perez-Schindler, J; Handschin, C (2013): Skeletal muscle PGC-1alpha controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor alpha-dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 8738–8743
 32. Summermatter, S; Thurnheer, R; Santos, G; Mosca, B; Baum, O; Treves, S; Hoppeler, H; Zorzato, F; Handschin, C (2012): Remodeling of calcium handling in skeletal muscle through PGC-1alpha: impact on force, fatigability, and fiber type. *American journal of physiology. Cell physiology* 302, 88-99
 33. Summermatter, S; Troxler, H; Santos, G; Handschin, C (2011): Coordinated balancing of muscle oxidative metabolism through PGC-1 α increases metabolic flexibility and preserves insulin sensitivity. *Biochemical and biophysical research communications* 408, 180–185
 34. Timmons, JA; Knudsen, S; Rankinen, T; Koch, LG; Sarzynski, M; Jensen, T; Keller, P; Scheele, C; Vollaard, NBJ; Nielsen, S; Akerstrom, T; MacDougald, OA; Jansson, E; Greenhaff, PL; Tarnopolsky, MA; van Loon, Luc J C; Pedersen, BK; Sundberg, CJ; Wahlestedt, C; Britton, SL; Bouchard, C (2010): Using molecular classification to predict gains in maximal aerobic capacity following endurance exercise training in humans. *Journal of applied physiology* 108, 1487–1496
 35. Timmons, JA; Larsson, O; Jansson, E; Fischer, H; Gustafsson, T; Greenhaff, PL; Ridden, J; Rachman, J; Peyrard-Janvid, M; Wahlestedt, C; Sundberg, CJ (2005): Human muscle gene expression responses to endurance training provide a novel perspective on Duchenne muscular dystrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 750–760
 36. Tunstall, RJ; Mehan, KA; Wadley, GD; Collier, GR; Bonen, A; Hargreaves, M; Cameron-Smith, D (2002): Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, 66-72
 37. van Wijhe, M; Blanchaer, MC; St. George-Stubbs, S (1964): The distribution of lactate dehydrogenase isozymes in human skeletal muscle fibers. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 12, 608–614
 38. Vogt, M; Puntchart, A; Howald, H; Mueller, B; Mannhart, C; Gfeller-Tuescher, L; Mullis, P; Hoppeler, H (2003): Effects of dietary fat on muscle substrates, metabolism, and performance in athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 35, 952–960
 39. Weber, K; Osborn, M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* 244, 4406–4412
 40. Wende, AR; Schaeffer, PJ; Parker, GJ; Zechner, C; Han, D-H; Chen, MM; Hancock, CR; Lehman, JJ; Huss, JM; McClain, DA; Holloszy, JO; Kelly, DP

(2007): A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling.
The Journal of biological chemistry 282, 36642–36651

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der funktionellen Aktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH).....	7
Abbildung 2: Einfluss von PGC-1 α auf die Regulation des Laktatstoffwechsels während Belastung	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der aufgestellten Hypothese.....	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Studienabschnitte der BAM-Studie (Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport).....	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zeitpunkte der Muskelbiopsientnahmen im Studienteil II der BAM-Studie (Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport)	20
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der mittels Ponceau S angefärbten Proteinbanden auf der PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran.....	28
Abbildung 7: Western Blot zur Testung der Spezifität der erhaltenen Antikörper (AK) für LDH-A (abcam®, ab47010) und LDH-B (abcam®, ab85319); Kreuzreaktion des als spezifisch für LDH-A beschriebenen AK mit LDH-B	29
Abbildung 8: Eingesanntes Beispiel eines Röntgenfilmes mit Darstellung der Proteinbanden für β -Actin, LDHA (Laktatdehydrogenase A) und LDHB (Laktatdehydrogenase B) nach Abschluss des Western Blot mit den aus verschiedenen Muskelbiopsien eines Probanden gewonnen Proteinlysaten zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten	31
Abbildung 9: eingescanntes Bandenmuster der Proteinexpression von LDH-B (Laktatdehydrogenase B) und β -Actin auf Röntgenfilm, und des daraus durch Image J für die LDH-B Banden erstellte Kurve	32
Abbildung 10: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung	36
Abbildung 11: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock.....	37

Abbildung 12: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge.....	39
Abbildung 13: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n=21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes	40
Abbildung 14: qPCR-Genexpressionsanalyse von PGC-1 α relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der Trainingsreihenfolge.....	41
Abbildung 15: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung	42
Abbildung 16: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock.....	43
Abbildung 17: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge.....	44
Abbildung 18: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes	45
Abbildung 19: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der Trainingsreihenfolge.....	46
Abbildung 20: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung	47
Abbildung 21: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock.....	48
Abbildung 22: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge.....	49
Abbildung 23: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes	50
Abbildung 24: qPCR-Genexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der	

Trainingsreihenfolge.....	51
Abbildung 25: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung.....	53
Abbildung 26: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock	54
Abbildung 27: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH in Ruhe bzw. nach Akutbelastung getrennt nach Trainingsblock und Trainingsreihenfolge.....	55
Abbildung 28: qPCR- Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes.....	56
Abbildung 29: qPCR-Genexpressionsanalyse Quotient LDH-A zu LDH-B jeweils relativ zu GAPDH; Daten aller Teilnehmer (n = 21) sortiert entsprechend des absolvierten Trainingsblockes und der Trainingsreihenfolge	57
Abbildung 30: Proteinexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu β -Actin; Einfluss Akutbelastung.....	58
Abbildung 31: Proteinexpressionsanalyse von LDH-A relativ zu β -Actin; Einfluss von Training entsprechend der Trainingsmodalität	59
Abbildung 32: Proteinexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss Akutbelastung.....	60
Abbildung 33: Proteinexpressionsanalyse von LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss von Training entsprechend der Trainingsmodalität	61
Abbildung 34: Proteinexpressionsanalyse Ratio LDH-A/LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss Akutbelastung.....	62
Abbildung 35: Proteinexpressionsanalyse Ratio LDH-A/LDH-B relativ zu β -Actin; Einfluss von Training entsprechend der Trainingsmodalität	63

8 Anhang

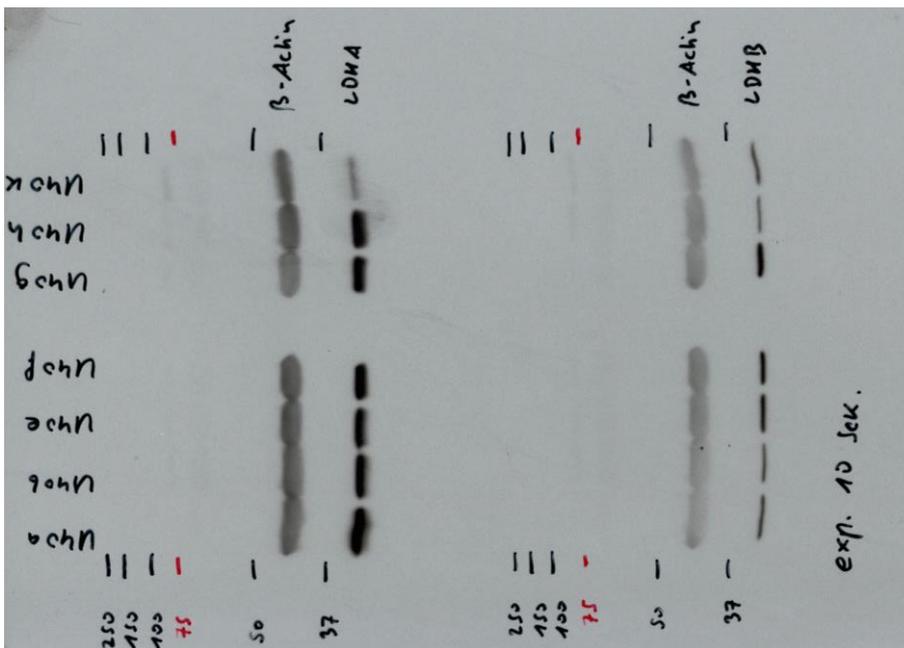
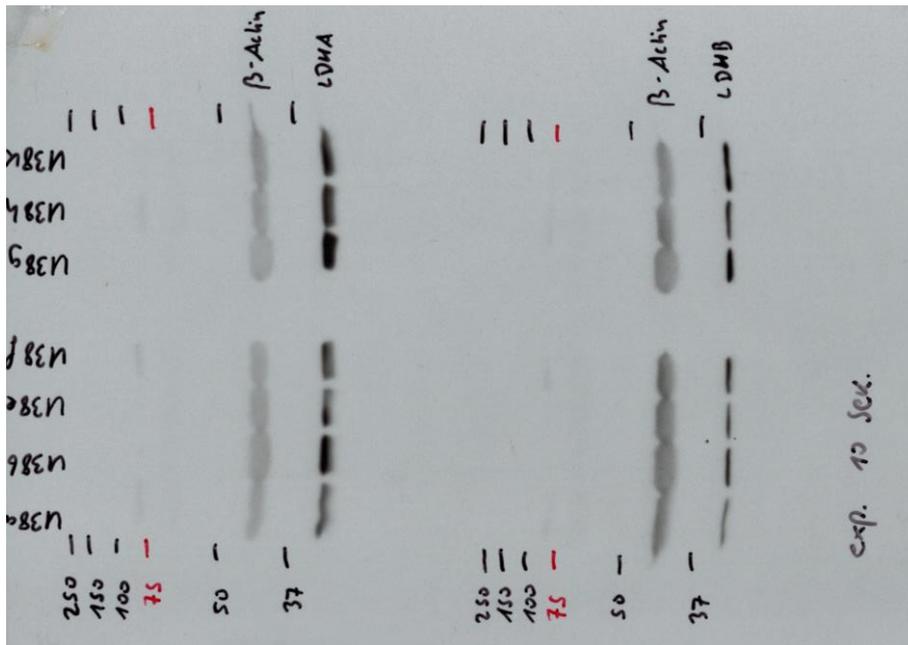
8.1 Aushang Probanden

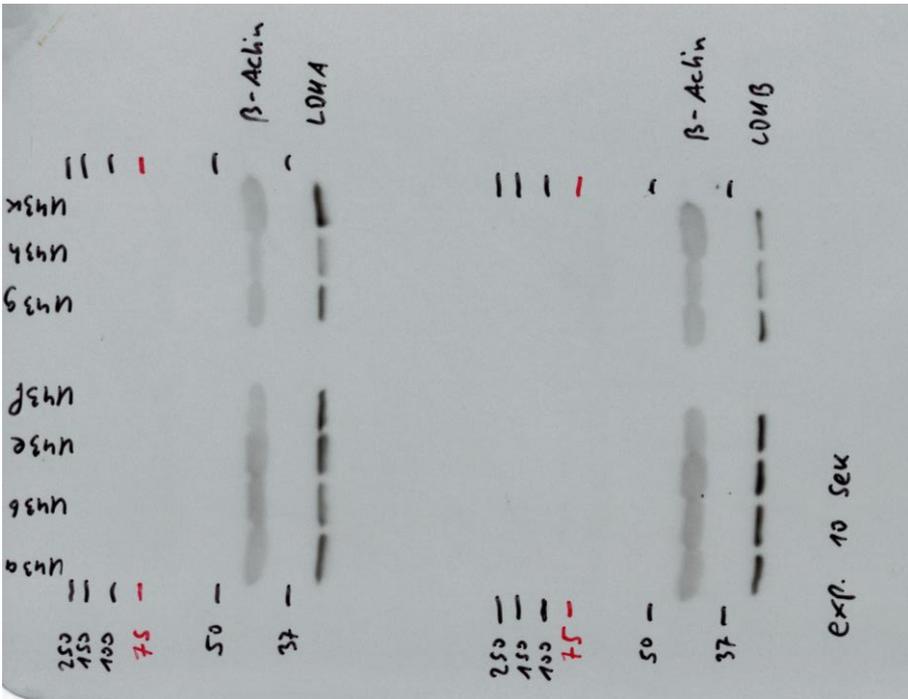
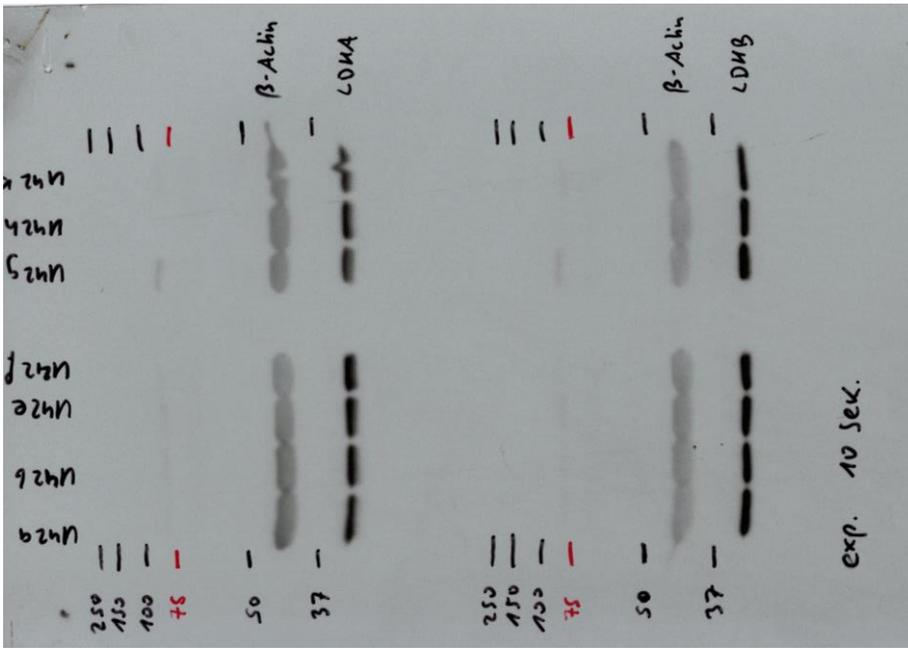
Die Abbildung des Plakates:

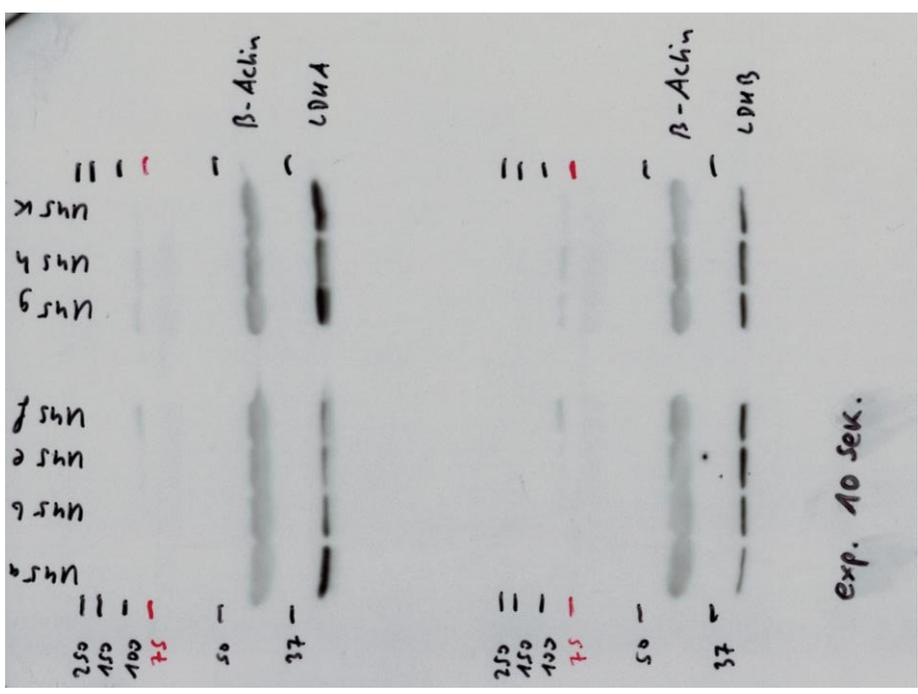
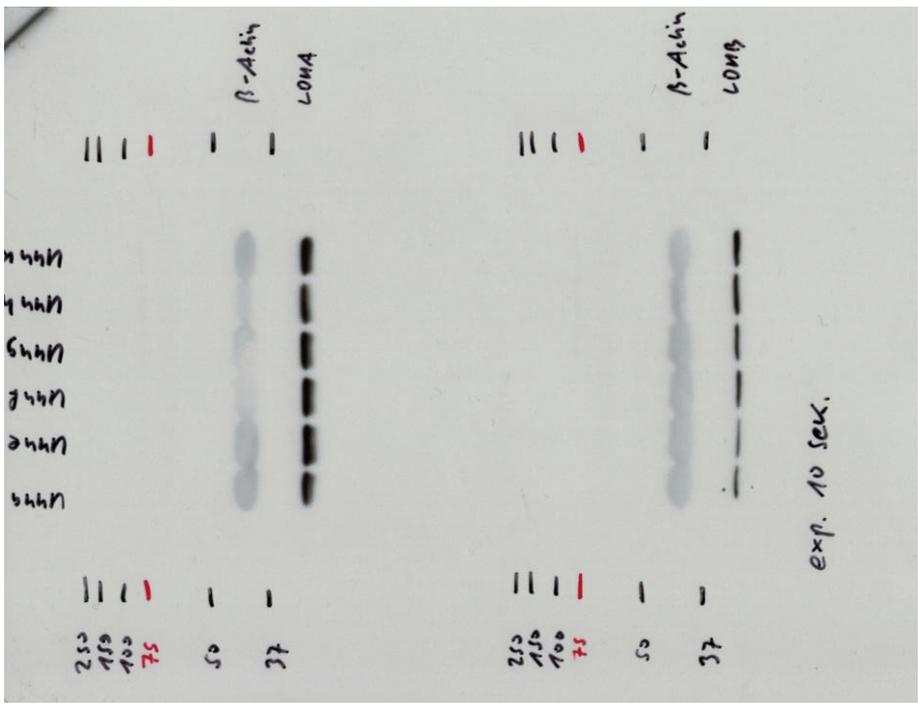
„BAM up your performance...“

zur Rekrutierung von Probanden wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

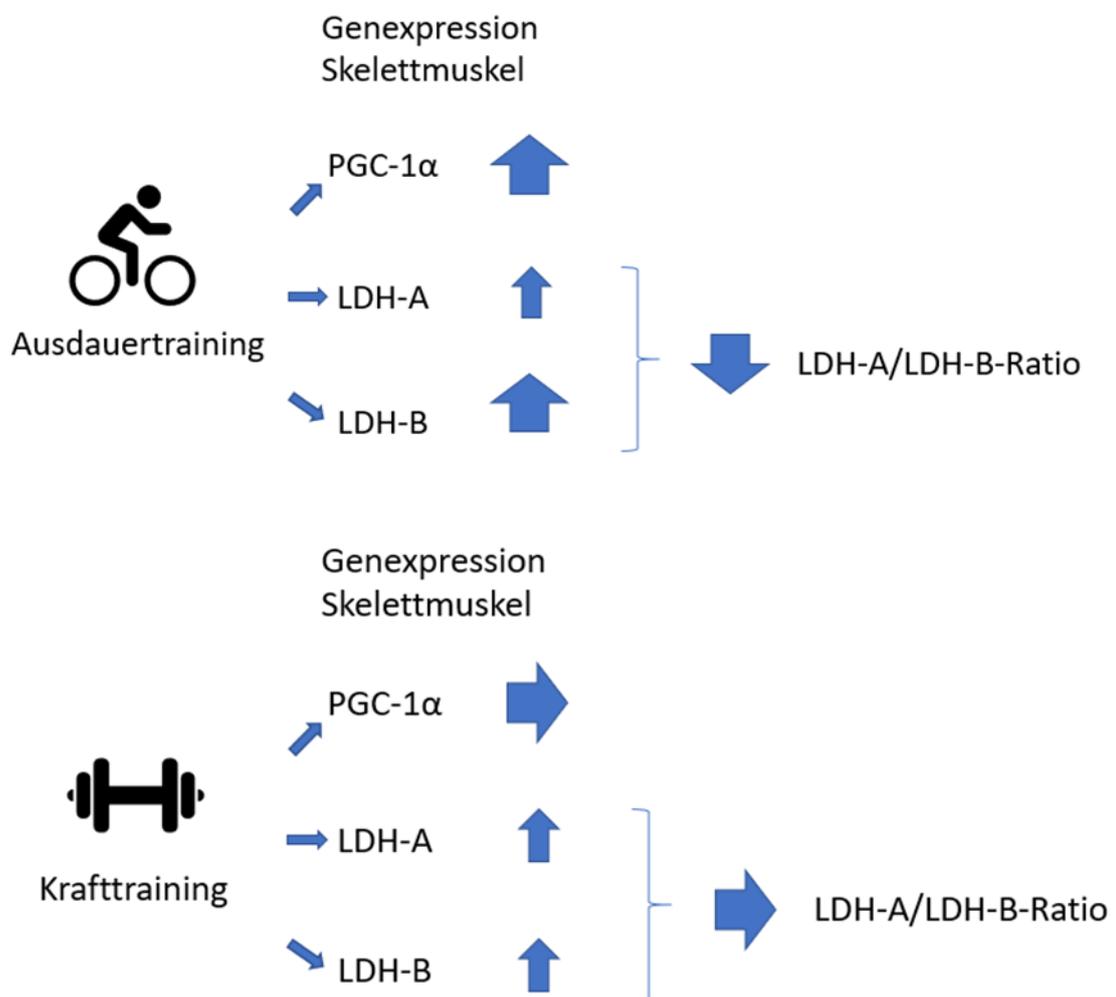
8.2 Bilddateien der eingescannten Röntgenfilme des Western Blot







8.3 Schematische Darstellung der Ergebnisse



Schematische Darstellung der Ergebnisse

Ausdauertraining wirken als Reize auf den Skelettmuskel ein und führen dort auf Ebene der Genexpression zu einer Steigerung von PGC-1 α , LDH-A und LDH-B. Daraus resultiert bei stärker ausgeprägter Expressionssteigerungen von LDH-B einer Reduktion der LDH-A/LDH-B-Ratio.

Krafttraining führt im gleichen Zeitraum zu keiner signifikanten Veränderung der PGC-1 α Expression, die LDH-A und LDH-B Expressionen steigen, die Ratio von LDH-A/LDH-B bleibt konstant.

PGC-1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; LDH-A = Laktatdehydrogenase-A; LDH-B = Laktatdehydrogenase-B

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Dr. Jürgen M. Steinacker, der sowohl mir wie auch unseren Probanden jeder Zeit unterstützend und aufmunternd zur Seite stand.

Meiner Betreuerin Dr. Martina Zügel (PhD) für ihre gute Betreuung, Unterstützung und Motivation.

Dr. Uwe Schumann der bei Bedarf immer bereit war zu helfen.

Jasmine-Léonike Buhl geb. Eismann und Thea Hama für ihre Beratung und Unterstützung bei der Aufarbeitung und Auswertung der Proben im Labor.

Unseren Probanden, die viel Zeit in das Training mit uns investiert haben und ohne die unsere Studie nicht möglich gewesen wäre.

Dem gesamten Team der Sportmedizin, die mich freundlich aufgenommen und unterstützt haben.

Meiner Familie und Freunden, die mir motivierend und unterstützend zur Seite standen.

Lebenslauf

Laura Isabella Wuschek

Geburtsdatum 05.06.1990
Geburtsort Schongau

Ausbildung

1996-1998	Grundschule in Aitrang/Allgäu
1998-2000	Grundschule in Schramberg
2000-2009	Gymnasium in Schramberg
darin 2007	Auslandsschuljahr in Rossland/Kanada
06/2009	Abitur am Gymnasium Schramberg
2009-2011	Studium der Humanmedizin an der Goethe-Universität Frankfurt/Main (Vorklinik) 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestanden September 2011
2011-2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm (klinischer Studienabschnitt) 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestanden Oktober 2014 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestanden November 2015
11/2015	Approbation als Ärztin
bis 06/2016	Datenauswertung für diese Dissertation
07/2016	Beginn der Weiterbildung in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Zentralklinikum Augsburg (seit 01.01.2019 Universitätsklinikum Augsburg)