

Aus dem Institut für Bewegungs- und Neurowissenschaft
Deutsche Sporthochschule Köln
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Heiko K. Strüder

Analyse molekularer Mechanismen trainingsbedingter Skelettmuskeladaptation

Von der Deutschen Sporthochschule Köln
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Sportwissenschaft
genehmigte Dissertation
vorgelegt von

Stephan Geisler

Köln 2011

Erster Referent:	Prof. Dr. Heiko K. Strüder
Zweiter Referent:	Prof. Dr. Patrick Diel
Vorsitzende des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. Wilhelm Bloch
Datum der Disputation:	09.11.2011

Eidesstattliche Versicherung:

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

Stephan Geisler

Danksagung:

Ich möchte mich für die außerordentliche Betreuung bei Prof. Dr. Patrick Diel herzlich bedanken! Er hat mir einen Einblick in die „molekulare Sportmedizin“ ermöglicht, den ich während meines Studiums nicht erahnen konnte. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Heiko Strüder, der mir diese Dissertation ermöglicht hat und natürlich Dr. Dr. Thorsten Schiffer, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit dem ich viele interessante und lustige Momente während der Arbeit hatte. Ohne Ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke dafür! Ich bedanke mich bei Prof Dr. Wilhelm Bloch, von dem ich sehr viel gelernt habe, bei Frau Prof. Dr. Klara Brixius für eine gute Zusammenarbeit und bei Dr. Angelika Friedel für die Einführung in die biochemischen Analysemethoden. Weiterhin danke ich meiner Mutter, meinem Bruder und meiner Freundin, die immer an mich geglaubt und mich immer unterstützt haben. Ich widme diese Arbeit meinem Opa und meinem Vater, die jetzt hoffentlich von „oben“ zuschauen und ein wenig stolz sind!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Myostatin	2
1.2 Struktur und Regulation von Myostatin	3
1.3 Myostatin im Tier	4
1.4 Myostatin im Menschen	8
1.5 Ziel der Arbeit	10
2 Material und Methode.....	12
2.1 Untersuchungsgut.....	12
2.2 Untersuchungsgang.....	14
2.2.1 Krafttraining	15
2.2.2 Ausdauertraining.....	16
2.3 Apparaturbesprechung / Diagnostik.....	16
2.3.1 Isometrische Maximalkraftmessung.....	16
2.3.2 One Repetition Maximum Test	17
2.3.3 Ausdauerleistung.....	18
2.3.4 Spirometrische Messung	19
2.3.5 Laktatmessung	20
2.3.6 Herzfrequenzmessung.....	20
2.4 Muskelbiopsie und Histologie	21
2.4.1 Biospietechnik.....	21
2.4.2 Verarbeitung des Gewebes	22
2.4.3 ATPase Färbung.....	23
2.4.4 Behandlung der Muskelfaserschnitte.....	24
2.4.5 Auswertung ATPase- Färbung.....	26
2.5 m-RNA Analyse	28
2.5.1 RNA-Isolation.....	28
2.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	29
2.5.3 DNase-Verdau	30
2.5.4 cDNA Synthese	31
2.5.5 Primer	32
2.5.6 Das Prinzip der PCR.....	33
2.5.7 Gelelektrophorese	35
2.5.8 Real-Time RT-PCR.....	36
2.6 Immunohistochemie und PCNA Färbung	39
2.6.1 Einbettung in Paraffin und Schnitt am Mikrotom.....	39
2.6.2 Entparaffinieren der Schnitte	40

2.6.3	Immunhistochemie.....	41
2.6.4	HE- Färbung	42
2.6.5	PCNA Färbung	44
2.7	Statistik	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Kraftwerte	49
3.1.1	Absolute und relative statische Kraft.....	49
3.2	Ausdauerwerte.....	52
3.2.1	Maximale Sauerstoffaufnahme	52
3.2.2	Herzfrequenz	56
3.3	Myostatinregulation.....	58
3.3.1	Myostatinwerte Kraftgruppe	58
3.3.2	Myostatinwerte Ausdauergruppe	59
3.3.3	Myostatinwerte Kontrollgruppe	60
3.3.4	Myostatinwerte im Gruppenvergleich.....	61
3.4	Muskelfaserdurchmesser.....	61
3.4.1	Muskelfaserdurchmesser Kraftgruppe im Probandenvergleich	62
3.4.2	Muskelfaserdurchmesser Ausdauergruppe im Probandenvergleich.....	63
3.4.3	Muskelfaserdurchmesser Kontrollgruppe im Probandenvergleich	65
3.5	Muskelfaserverteilung	66
3.5.1	Faserverteilung Kraftgruppe	66
3.5.2	Faserverteilung Ausdauergruppe.....	67
3.5.3	Faserverteilung Kontrollgruppe.....	68
3.6	Quantifizierung von proliferativen Satellitenzellen	68
4	Diskussion	70
4.1	Kraft- und Ausdauerwerte	70
4.2	Myostatinwerte.....	72
4.3	Muskelfaserdurchmesser.....	83
4.4	Muskelfaserverteilung	88
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	94
	Abkürzungsverzeichnis	103
	Abbildungsverzeichnis	105
	Tabellenverzeichnis	108
	Lebenslauf	109

1 Einleitung

Der humane Skelettmuskel zeichnet sich durch seine außerordentliche Plastizität in Reaktion auf mechanische und metabolische Stimuli aus. "Form follows function", die Form folgt der Funktion ist Teil des Wolff'schen Transformationsgesetzes und meint, dass sich die äußere Form und innere Struktur des menschlichen Organismus an die mechanischen bzw. funktionellen Bedingungen anpassen. Wolff bezog diesen Ausspruch im 19. Jahrhundert auf die Adaptationsfähigkeit des humanen Knochens. Allerdings wurde in den letzten Jahren und Jahrzehnten durch die weitere Erforschung des Skelettmuskels mittels molekularbiologischer Analyseverfahren und histologischer Präparationstechniken immer deutlicher, dass dieser Satz auch auf die Anpassungsfähigkeit des Skelettmuskels passt. Die molekularen Anpassungsmechanismen der Skelettmuskulatur zu ergründen ist nicht nur aus sportwissenschaftlicher Sicht von Bedeutung, sondern auch aus medizinischer und therapeutischer Sicht. Die Adaptation basiert vermutlich auf einem sehr komplexen Zusammenspiel von Hormonen und Genen, deren Wirkungsweise bis heute nicht vollkommen geklärt wurden. Die Einführung der Hohlnadelbiopsie (Bergström und Hultman 1966) erlaubte erstmals die Entnahme und Analyse von Muskelgewebe, ohne Sportler, Probanden oder Patienten nachhaltig zu schädigen, und trug somit zum Verständnis der Anpassungsfähigkeit des Muskels entscheidend bei. Veränderungen der Strukturen konnten somit histologisch dargestellt werden und moderne Analyseverfahren der Molekularbiologie erlaubten es die Chemie des Muskels und sogar dessen RNA zu untersuchen (Baldwin 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf den so genannten Wachstumsfaktor Myostatin, auch GDF-8 (Growth and Differentiation Factor 8) gerichtet, der einen wichtigen Stellenwert in der Anpassungsfähigkeit des Skelettmuskels einnimmt. Seit seiner Entdeckung im Jahre 1997 (McPherron und Lee 1997) wurde dieser Wachstumsfaktor immer wieder mit enormem Muskelwachstum in Verbindung gebracht und sowohl in der Therapie, z.B. bei Muskelerkrankungen, als auch im

Bereich des Dopings kontrovers diskutiert. Kern der vorliegenden Studie ist es durch eine Intervention herauszufinden, inwiefern dieser Wachstumsfaktor durch körperliches Training beeinflusst werden kann.

1.1 Myostatin

Im Jahre 1997 entdeckte Alexandra C. McPherron auf der Suche nach weiteren, unbekanntem Mitgliedern der TGF- β Familie (transforming growth factors- β) das aus 375 Aminosäuren bestehende Protein Myostatin (McPherron et al. 1997a). Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass Myostatin ein negativer Wachstumsregulator des Muskelgewebes ist. Durch so genannte „Knock-Out“ Modelle kam es bei Mäusen zu einer extremen Zunahme von Muskelgewebe, die sowohl auf eine Hypertrophie als auch auf eine Hyperplasie des Gewebes zurückzuführen war (McPherron et al. 1997b; Lee et al. 2001). Myostatin bindet spezifisch an den Activin-Typ-II-Rezeptor (ActRIIA) und kann durch das Propeptid Follistatin an dieser Bindung gehindert werden, in dem es die Bindungsstelle blockiert. Versuche an transgenen Mäusen zeigten, dass eine erhöhte Follistatinproduktion und/oder defekten ActRIIA Rezeptoren ein ähnliches Muskelwachstum hervorriefen wie jene im „Knock-Out“ Model (Lee et al. 2001; Huet et al. 2001). In vitro Versuche zeigten, dass eine erhöhte Myostatinkonzentration die Ausdifferenzierung von Myoblasten herabsetzte, da sie wahrscheinlich den Zellteilungszyklus in der so genannten G1 Phase zum Erliegen bringt (Thomas et al.2000).

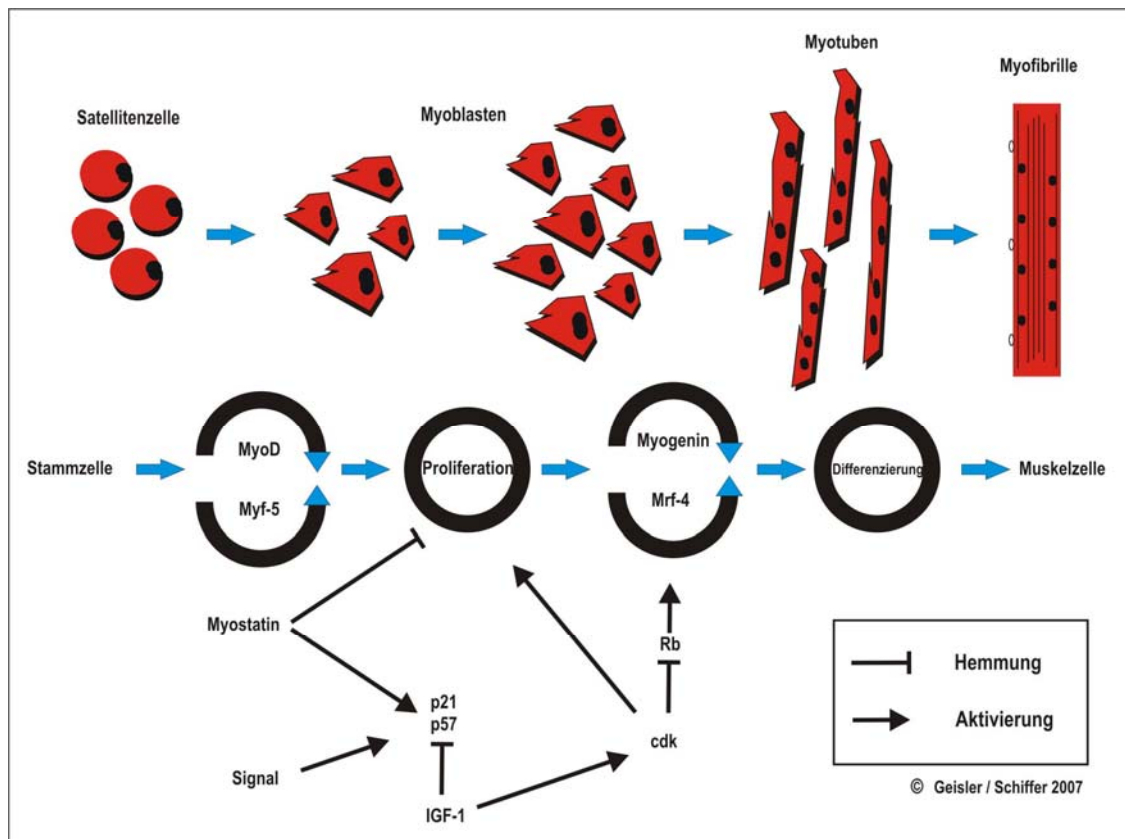


Abbildung 1: Entwicklung der Stammzelle zur Muskelzelle

Quelle: modifiziert nach Thomas et al. 2000

Bogdanovich et al. (2002) konnten durch die Gabe von spezifischen Myostatinantikörpern das Muskelwachstum und die Leistung von Mäusen mit einem Dystrophiephänotypen verbessern und stellten somit erstmalig die These auf, dass die Manipulation des Myostatingens aus therapeutischer Sicht, z.B. bei Dystrophiepatienten, durchaus eine adäquate Therapieform darstellen könnte.

1.2 Struktur und Regulation von Myostatin

Myostatin wird als ein 375-Aminosäure großes Vorläuferprotein synthetisiert, welches durch Proteolyse zu einem 26 kDA Homodimer führt (Thomas et al. 2000). Das Myostatingen kodiert eine kleine Signalsequenz im N-terminalen Bereich, gefolgt von einer großen Propeptidregion und einer kleineren „reifen“ Domäne am C-Terminus (McPherron et al. 1997). Die kleine Signalsequenz ist

für die Entwicklung und Sekretion verantwortlich. Die große Propeptidregion reguliert die biologische Aktivität des Myostatin und die ausgereifte Region bindet an einen der beiden Aktivin II Rezeptoren (ActRIIB zu größeren Anteilen als ActRIIA) (Patel et al. 2005). Myostatin durchläuft zwei proteolytische Prozessierungen. Wie auch bei anderen Mitgliedern der TGF- β Familie ist dies die Abspaltung des Signalpeptids sowie die Abspaltung der Pro-Domäne des biologisch aktiven C-Terminus (Zhu et al. 2000). Mutationen an dieser Stelle im Gen verursachen einen Abbruch der Signalkaskaden.

Es existieren verschiedene Proteine, denen eine regulierende Funktion auf das Myostatingen nachgewiesen wurde. Ein Protein, welches auch für die Hemmung anderer Mitglieder der TGF- β Familie genutzt wird, ist Follistatin. Es bildet zusammen mit Myostatin einen Komplex und unterbindet somit eine Signalkaskade (Lee et al. 2001). Ähnlich wie das Follistatin verhindern auch zum Beispiel FLRG (follistatin related gene) und GASP-1 (growth and differentiation factor-associated serum protein -1) die entfaltete Wirkung des Myostatin (Hill et al. 2003).

1.3 Myostatin im Tier

Im Jahre 1997 wurde erstmalig homozygote Myostatin „Knock-Out“ Mäuse gezüchtet und man beobachtete eine zwei- bis dreifach vergrößerte Muskelmasse an den Tieren die deshalb auch „Mighty mice“ (siehe Abbildung 2) genannt wurden (McPherron et al. 1997a).



Abbildung 2: Myostatin Knock-Out Maus „Mighty mouse“ neben Wildtyp(links); Wildtyp in der linken Spalte, Follistatineinfluss in der mittleren Spalte, Myostatin Knock-Out Maus in der rechten Spalte(rechts).

Quelle: links: McPherron et al. 1997; rechts: Lee et al. 2001

Allerdings wurde das Phänomen einer extrem vergrößerten Muskulatur bei Tieren schon vor über 200 Jahren dokumentiert. Bei der über Jahrhunderte gezüchteten Rinderrasse „Belgian Blue Cattle“ (siehe Abb. 3) konnte ebenfalls im Jahre 1997 eine Deletion des Myostatingens nachgewiesen werden (Grobet, Martin et al. 1997). Das so genannte „double-muscling“ Phänomen wurde wahrscheinlich über einen langen Zeitraum durch die Kreuzung der stärksten und muskulösesten Rinder erreicht (Dickman 1997).



Abbildung 3: „Belgian Blue Cattle“ Bulle mit Myostatindefekt.

Quelle: McPherron et al. 1997.

Das Texelschaaf ist für seine außergewöhnliche Muskulatur bekannt (Abbildung 4). Sie werden seit vielen Jahren entsprechend gezüchtet und Clop et al. (2006) fanden auch hier eine Mutation des Myostatin Gens an einer Romanov Texel F2 Population.



Abbildung 4: Texelschaaf mit Myostatindefekt.

Quelle: Clop et al. 2006.

Im Jahre 2007 entdeckten Mosher et al. eine ähnliche Mutation an einer Hunderasse namens „Whippet“ (Abb. 5). Diese Hunde gehören zu den schnellsten Rennhunden der Welt und es gibt bei dieser Rasse unterschiedliche Ausprägungen der Muskelmasse. So genannte „Bully-Whippets“ haben eine extrem große Muskelmasse im Gegensatz zu dem normalen Wildtyp. Ein weiterer Mischtyp ist mit einer leicht vergrößerten Muskulatur ausgestattet und erreicht bei den meisten Hunderennen die besten Ergebnisse. Im Gegensatz zu dem Wildtyp, bei dem kein Defekt des Myostatingens gefunden wurde, wurde bei dem sehr schnell laufenden Mischtyp eine heterozygote Ausprägung des Myostatindefektes detektiert. Bei den extrem muskulösen Tieren (Bully-Whippets) fand man hingegen eine homozygote Ausprägung des Defekts und keine besondere Schnelligkeitsleistung beim Rennen. Die Autoren postulierten daraus die erste quantitative Verlinkung einer Myostatin Genmutation und einer Steigerung der sportlichen Leistungsfähigkeit und empfehlen die Durchführung von Myostatin Screening Testverfahren im Sport (Mosher et al. 2007).



Abbildung 5: Whippet Dog Wildtyp (links), Whippet Dog mit heterozygotem Myostatindefekt (mitte), „Bully“ Whippet Dog mit homozygotem Myostatindefekt (rechts).

Quelle: Mosher et al. 2007.

Selbst bei Fischen (Amali et al. 2004) und Vögeln (Castelhano-Barbosa et al. 2005) konnten verschiedene Mutationen des Myostatingens nachgewiesen werden, allerdings ohne dass ein besonderes Wachstum der Skelettmuskulatur beobachtet worden ist. Buel et al. (2008) schlussfolgern aus der Tatsache, dass bei vielen Fischarten keine regulatorische Funktion des Skelettmuskelwachstums dem Myostatin zugeordnet werden konnte, dass Myostatin auch in der Regulation anderer Organe, wie z.B. dem Gehirn, wo es beim Fisch besonders ausgeschüttet wird, oder dem Herzen, eine essentielle

Rolle spielen könnte. Die Spezifität des Myostatins bzw. dessen Regulationsmechanismen scheint bei Säugetieren stärker ausgeprägt als bei Wirbeltieren, wo sie anscheinend aufgrund der breiteren Streuung von Activin Rezeptoren deutlich undifferenzierter zu sein scheint (Kos et al. 1997; Garg et al. 1999; Buel et al. 2008).

1.4 Myostatin im Menschen

Unmittelbar nach der Entdeckung des Myostatingens und seiner Funktion im Mausmodell (McPherron et al. 1997), veröffentlichten Gonzales-Cadavid et al. (1998) erste Untersuchungen der Myostatinkonzentration im Menschen. Sie verglichen die Myostatinwerte im Serum von HIV infizierten Männern mit denen von gesunden Männern und fanden eine deutlich erhöhte Konzentration bei den krankheitsbedingt muskulär-atrophen Patienten. Zachwieja et al. (1999) fanden bei zwölf jungen, gesunden Männern nach 25-tägiger Bettruhe mit 6° Neigung eine signifikante Erhöhung der Myostatinkonzentration im Plasma um 12%. Yarashiki et al. (2002) untersuchten die Myostatinwerte von Menschen unterschiedlichen Alters und fanden bei der Gruppe zwischen 76 und 92 Jahren deutlich höhere Konzentrationen im Plasma als bei Menschen zwischen 60 und 75 Jahren und bei diesen wiederum höhere Konzentrationen als bei der jüngsten Gruppe zwischen 19 und 35. Außerdem korrelierten die erhöhten Myostatinwerte mit einem fortgeschrittenen Muskelabbau im Alter, welcher im Allgemeinen als Sarkopenie beschrieben wird.

Im Jahre 2004 veröffentlichte Schuelke et al. (2004) erstmalig eine Fallstudie, bei der ein Defekt im Myostatingen bei einem Neugeborenen gefunden wurde (Abbildung 6). Das Kind wurde bereits mit einer deutlich gesteigerten Muskelmasse geboren und das Muskelwachstum schritt enorm schnell voran. Bei dem Kind konnten keinen abnormen Hormonwerte oder ähnliches festgestellt werden und es war gesundheitlich unauffällig. Untersuchungen zeigten, dass das Kind eine homozygote Mutation im Myostatingen trägt. Ein

solches Muskelwachstum kurze Zeit nach der Geburt wurde bis dato noch nie in einer ähnlichen Form beobachtet.

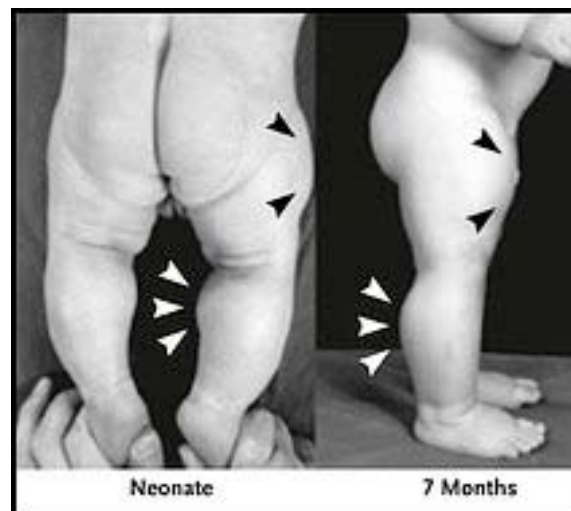


Abbildung 6: Neugeborenes Kind mit Myostatindefekt (links), 7 Monate altes Kind mit Myostatindefekt (rechts).

Quelle: Schuelke et al. 2004.

Wie und ob die Myostatinexpression sich bei körperlicher Belastung bzw. unter Trainingsbedingungen verändert, untersuchten verschiedene Forschungsgruppen mit unterschiedlichen Ergebnissen. So fanden Roth et al. (2003) nach einem neunwöchigen Krafttraining einen deutlichen Rückgang der Myostatinexpression während Hulmi et al. (2007) nach einem einundzwanzigwöchigen Krafttraining eine Erhöhung der Myostatinexpression nachweisen konnten. Kopple et al. (2006) konnten nach einem neunwöchigen Ausdauertraining mit Dialysepatienten eine signifikante Senkung der Myostatinexpression nachweisen.

Eine künstliche Inhibition des Myostatingens wird seit einigen Jahren schon als mögliche Therapie für verschiedene Erkrankungen wie Muskeldystrophien etc. diskutiert. Die ersten klinischen Studien mit spezifischen Myostatinblockern (Myo-029) wurden bereits an Muskeldystrophypatienten erprobt (Wagner et al. 2008) mit dem Ergebnis, dass keine ernsthaften Nebenwirkungen allerdings

auch kein besonderes Muskelwachstum beobachtet wurde. Nicht nur in der Behandlung von Muskelerkrankungen sind Myostatinblocker seit Jahren in der Diskussion. Seine Muskelmasse steigernde Wirkung wird auch im Bereich der Anti- Doping Forschung seit Jahren verfolgt. Speziell in der Bodybuildingszene werden seit Jahren Produkte auf den Markt gebracht, die eine vermeidlich inhibitorische Wirkung auf das Myostatingen versprechen (siehe Abbildung 7). Allerdings wurde die Wirkung dieser pflanzlichen Stoffe bereits in Studien erprobt und ergab gegenüber einem Placebopräparat keinerlei Vorteil hinsichtlich eines Muskelmassezuwachses (Willoughby 2004). Solche Produkte sind weiterhin frei im Handel erhältlich und werden in einschlägigen Foren kritisch diskutiert.

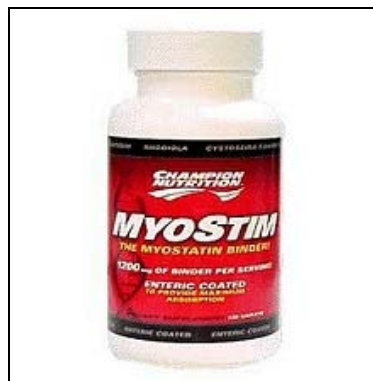


Abbildung 7: Angeblicher Myostatinblocker frei im Internet erhältlich, Wirkstoff: cystoseira canariensis

Quelle: <http://www.a-z-nutrition.com/champion-myostim.html>.

1.5 Ziel der Arbeit

Der Stand der derzeitigen Forschung lässt vermuten, dass Myostatin ein wichtiger, negativer Wachstumsfaktor der Skelettmuskulatur ist. Sowohl beim Tier als auch beim Menschen haben verschiedene Studien diesen Rückschluss bekräftigt. Welchen Einfluss körperliches Training auf die Expression von Myostatin hat und welche Art von Training welche Regulation hervorruft, ist allerdings bisher noch unklar. Besonders im Bereich der Anti- Dopingforschung ist das Wissen über mögliche, trainingsbedingte Adaptationen der Myostatinexpression von spezieller Bedeutung. Ziel der vorliegenden Studie ist

es, Unterschiede in der Expression von Myostatin als Reaktion auf ein gezieltes Krafttraining bzw. Ausdauertraining aufzuzeigen.

2 Material und Methode

2.1 Untersuchungsgut

Die Untersuchungen fanden im Institut für Motorik und Bewegungstechnik der Deutschen Sporthochschule Köln statt. Die Eingangs- und Ausgangsuntersuchungen wurden im November und im Februar durchgeführt. Dazwischen lag eine zwölfwöchige Trainingsphase. Die Auswahl der männlichen Probanden erfolgte randomisiert. Voraussetzung war, dass keiner der Probanden spezifisch ausdauer- oder krafttrainiert sein durfte. Die Teilnahme an der Untersuchung erfolgte auf freiwilliger Basis. Zu Beginn des Untersuchungszeitraumes fand eine Aufklärung der Probanden bezüglich der Ziele, des Ablaufs und des zeitlichen Aufwandes der Untersuchung sowie über Risiken und Nutzen der geplanten Tests statt. Dies wurde von den Teilnehmern in Form einer Einverständniserklärung schriftlich bestätigt.

Die Probandengruppe setzte sich aus 33 Studenten im Alter von 19 bis 25 Jahren zusammen. Um für die Ergebnisse berücksichtigt zu werden, mussten die Probanden mindestens 90% des Trainingspensums erfüllen. Aufgrund von Verletzungen konnten daher sechs Probanden für die statistische Auswertung nicht berücksichtigt werden. Das durchschnittliche Alter lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei $22,2 \pm 1,8$ Jahren. Die Größe der Probanden betrug $183,15 \pm 5,87$ cm. Das Gewicht lag bei $77,8 \pm 8$ kg. Es handelte sich bis auf eine Ausnahme um Sportstudenten.

ID	Gruppe	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	Sportart
1	Ausdauer	24	185	70	Beachvolleyball, Klettern
2	Kraft	22	192	78	Basketball
3	Kraft	23	179	75	Fußball
4	Kontrolle	22	174	64	Hobbysport
5	Kontrolle	21	186	68	Schwimmen
6	Kontrolle	23	181	71	Unisport
9	Kraft	24	180	68	Ju-Jutsu
10	Kontrolle	25	188	72	Volleyball
11	Kraft	24	187	75	Unisport
13	Ausdauer	24	186	87	Unisport
14	Ausdauer	21	184	82	Unisport
15	Ausdauer	24	186	94	Unisport
16	Kontrolle	21	189	92	Tennis
17	Kraft	20	176	85	Unisport
18	Ausdauer	21	180	72	Radfahren
19	Ausdauer	20	187	76	Fußball
21	Kontrolle	25	190	77	Kajak
22	Kraft	21	179	70	Tennis
24	Kontrolle	25	191	82	Hobbysport
25	Kraft	22	183	74	Unisport
26	Ausdauer	24	184	83	Handball, Radfahren
27	Ausdauer	22	180	90	Basketball
28	Kraft	22	176	76	Unisport
29	Kontrolle	19	173	74	Leichtathletik
30	Kraft	21	180	80	Eishockey
32	Kontroll	20	174	74	Fußball
33	Kraft	19	195	91	Basketball
MW		22,2	183,1	77,8	
SD		1,8	5,9	8,0	

Tabelle 1: Anthropometrische Daten der Probanden (Alter, Größe, Gewicht) und deren Hauptsportart vor Studienbeginn (durchschnittlich 2-3 TE/Woche).

Nach den Eingangsuntersuchungen erfolgte eine randomisierte Gruppenzuweisung. 22 Probanden wurden entweder der Kraftgruppe (N=11, Alter $21,8 \pm 1,62$ Jahre) oder der Ausdauergruppe (N=11, Alter $22,6 \pm 1,51$ Jahre) zugeordnet; die übrigen elf Probanden dienten als Kontrolle. Im Anschluss an die Eingangsuntersuchungen fand die zwölfwöchige

Trainingsphase statt. Die Teilnehmer der Trainingsgruppen trainierten an drei Tagen in der Woche, mit einem Abstand zwischen den Trainingseinheiten von mindestens 48 Stunden. Nach einer achtwöchigen Trainingsphase erfolgte eine Zwischentestung der Kraft- und Ausdauergruppe, um die Trainingsintensität anzupassen. Hierzu vollzog die Kraftgruppe erneut einen One Repetition Maximum Test, und die Ausdauergruppe eine Laufbandspiroergometrie inklusive Laktat- und Herzfrequenzmessung. Die Abschlussuntersuchungen waren identisch zu den Eingangsuntersuchungen aufgebaut und erfolgten beginnend in der zwölften Trainingswoche. Es wurde darauf geachtet, dass bei den Abschlussuntersuchungen die gleiche Reihenfolge und Uhrzeiten wie bei der Eingangsuntersuchungen eingehalten wurden.

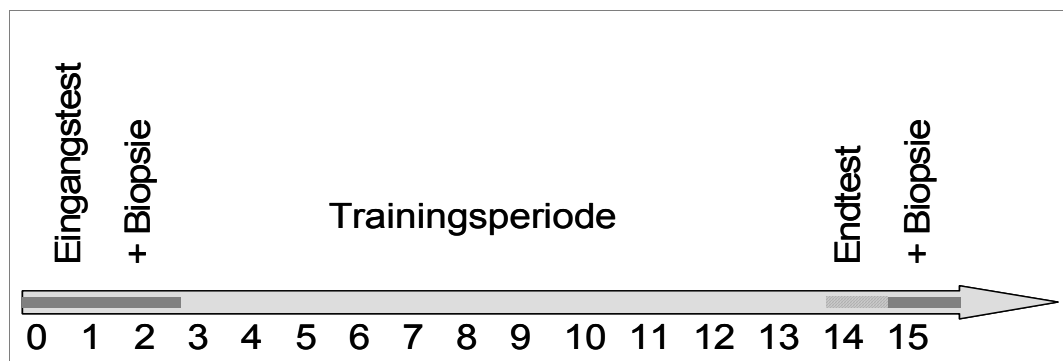


Abbildung 8: Zeitverlauf der Studie von Woche 0 bis Ende der 15. Woche.

2.2 Untersuchungsgang

Das zwölfwöchige Krafttraining und Ausdauertraining der jeweils elf Probanden umfasste drei Trainingseinheiten pro Woche an nicht aufeinander folgenden Tagen. Nach einem Zwischentest in der achten Trainingswoche wurden die Trainingsintensitäten entsprechend den Leistungsveränderungen angepasst. Im Zwischentest absolvierten die Probanden der Kraftgruppe erneut einen One Repetition Maximum Test und die Probanden der Ausdauergruppe einen stufenförmigen Belastungstest auf dem Laufband.

2.2.1 Krafttraining

Die elf Probanden trainierten dreimal pro Woche an nicht aufeinander folgenden Tagen. Die Trainingsintensität wurde anhand des One Repetition Maximum (1RM) Test festgelegt, welche in der ersten Trainingseinheit ermittelt worden war. Die Intensität entsprach einem Trainingsgewicht von 70-80% des 1RM und einer Wiederholungszahl von acht bis zehn. Dabei sollte jeder Bewegungszyklus (konzentrisch – exzentrisch) drei bis vier Sekunden andauern und in gleichmäßigem Tempo durchgeführt werden. Die Pausenzeiten zwischen den drei Trainingssätzen betragen ein bis zwei Minuten und zwischen den jeweiligen Gerätestationen zwei bis maximal drei Minuten. Um eventuelle Kraftzuwächse zu berücksichtigen wurden die Probanden angewiesen, das Trainingsgewicht selbständig zu regulieren. Das Gewicht sollte erhöht werden, wenn zehn Wiederholungen problemlos mit dem ursprünglichen Gewicht absolviert werden konnten.

Ergänzend zum Krafttraining der Oberschenkelvorderseite an der „Leg-Extension Machine“ wurden folgende Geräte mit in das Training involviert:

- Beinbeuger (Mm. Ischiocrurales)
- Brustpresse (M. pectoralis major)
- Beinpresse (M. quadrizeps femoris, M. glutaemus maximus)
- Latissimuszug (M. latissimus dorsi, M. biceps brachii)
- Rudern (M. trapezius, M. rhomboideus)
- Seitheben (M. deltoideus)
- Crunches (M. rectus abdominis)
- Hyperextension (M. erector spinae)

Das Ganzkörpertraining wurde ebenfalls mit der oben genannten Intensität durchgeführt. Die Übungen für Bauch (Crunches) und Rücken (Hyperextension) wurden in den drei Sätzen jeweils bis zur Erschöpfung ausgeführt.

2.2.2 Ausdauertraining

Das Ausdauertraining erfolgte in Form eines 45-minütigen Laufes je Trainingseinheit. Die Trainingsintensität wurde dabei über Herzfrequenzmessung gesteuert. Für das Training wurden Herzfrequenzen herangezogen, die 80% der Herzfrequenz an der aerob-anaeroben Schwelle entsprachen (Mader et al., 1989).

2.3 Apparaturbesprechung / Diagnostik

2.3.1 Isometrische Maximalkraftmessung

Die isometrische Maximalkraftmessung erfolgte für alle Probanden auf dem zugleich gemeinsamen Gerät, der Leg-Extension Maschine der Firma Gym 80 (Gelsenkirchen, Deutschland). Die Messung fand in exakt normierter Position statt (Abb. 9):

- Übliche aufrechte Sitzposition – Rücken am Polster
- Die Kniebeugen liegen am Polster an und die Femurkondylen befinden sich auf der Höhe der Drehachse des Gerätes
- Das Fußpolster wird am distalen Ende des Unterschenkels aufgelegt
- Die Füße der Probanden sind dorsalflektiert
- Der Kniewinkel beträgt 120°
- Die Knie- und Fußbreite entspricht der Hüftbreite
- Die Zehenspitzen zeigen nach vorne



Abbildung 9: Isometrische Maximalkraftmessung bei einem Kniewinkel von 120°.

Nach einem spezifischen, dynamisch-vollamplitudigen Aufwärmsetz mit einheitlichen 40 kg Gewicht wurden je Proband drei Messungen bilateral zur Bestimmung der statischen Maximalkraft durchgeführt. Die Probanden wurden angewiesen, mit größtmöglicher Kraft in das Polster zu pressen. Zwischen den Versuchen lagen 30-sekündige Pausen. Die Messdauer des Computers betrug zehn Sekunden. In dieser Zeit sollte zunächst Vorspannung erzeugt werden, um dann, auf ein akustisches Signal hin, die größtmögliche Kraft zu entfalten. Die Maximalkraftaufnahme erfolgte über einen Kraftaufnehmer der Firma Mechatronic (Darmstadt, Deutschland), dessen Abtastrate bei 100 Hz und die Messgenauigkeit bei 0,01 N und 0,01 S liegen. Der Kräfteinsatz wurde vom Versuchsleiter nach etwa fünf Sekunden gestoppt.

2.3.2 One Repetition Maximum Test

Um das Trainingsgewicht zu bestimmen, wurde ein so genannter „One Repetition Maximum“ Test (Baechle [Hrsg.], 2000) an den Trainingsgeräten durchgeführt, bei welchem in maximal fünf Versuchen das jeweils höchste konzentrisch erreichbare Gewicht herausgefunden wurde. Die Pausenlänge

zwischen den Versuchen lag bei zwei Minuten. Die Ausführungskriterien wurden, bis auf die Bewegungsgeschwindigkeit, vom dynamischen Maximalkrafttest übernommen, d.h. die Bewegungsamplitude reichte von einem Knieinnenwinkel von 90° bis zur größtmöglichen Kniestreckung. Die Bewegungsgeschwindigkeit wurde auf drei bis vier Sekunden pro Bewegungszyklus (eine Wiederholung konzentrisch-exzentrisch) festgelegt, um den Anforderungen der Trainingsdurchführung zu entsprechen.

2.3.3 Ausdauerleistung

Der spiroergometrische Test wurde als stufenförmiger Belastungstest auf einem Laufband der Firma Woodway GmbH (Weil am Rhein, Deutschland) durchgeführt. Die Einstiegsbelastung lag bei 7,0 km/h (1,94 m/s). Daraufhin wurde die Belastung alle fünf Minuten um 1,5 km/h (0,42 m/s) bis zur Ausbelastung (maximal möglichen Belastung) gesteigert.

Die Ausbelastung kennzeichnete sich dadurch, dass die Probanden aufgrund von subjektiver Erschöpfung nicht mehr in der Lage waren die erforderliche Geschwindigkeit zu laufen. Zu den objektiven Ausbelastungskriterien zählen der Respiratorische Quotient (>1,0), Laktatwerte (8-10 mmol/l), und die Herzfrequenz (>190 Schläge pro Minute).

Während der Untersuchung wurden über ein offenes Spirometriesystem kontinuierlich die Atemgase analysiert. Die Dauer der einzelnen Laufphasen betrug vier Minuten, an welche sich jeweils eine Minute angliederte, in der die Blutabnahme aus dem Ohrläppchen zur Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte. Die Messung der Herzfrequenz wurde in den letzten Sekunden einer jeden Laufstufe durchgeführt. Zusätzlich wurde das subjektive Belastungsempfinden nach der Skala von Borg (1974) notiert. Bei den stufenförmigen Belastungen wurden die Probanden durch den Versuchsleiter verbal ermuntert sich maximal zu belasten. Ebenfalls wurden die Probanden angehalten, einen gleichmäßigen Laufrhythmus beizubehalten und von Änderungen des natürlichen Laufstils abzusehen.



Abbildung 10: Laufbandtest mit spirometrischer Messung

2.3.4 Spirometrische Messung

Die Messung der spirometrischen Daten während der Stufentests erfolgte mit dem ZAN-680 ErgoSpirometrie-System der Firma ZAN (Oberthulba, Deutschland). Alle Messdaten wurden kontinuierlich für jeden Atemzug (breath-by-breath) ermittelt. Dazu diente eine Mund und Nase umschließende Silikonmaske, an welche der Messkopf des Spirographensystems angeschlossen wurde. Während der Spirometrie wurden folgende für die Auswertung entscheidenden Parameter aufgezeichnet, bzw. nach der Messung berechnet:

- Sauerstoffaufnahme in Millilitern pro Minute (VO_2)
- Kohlendioxydabgabe in Millilitern pro Minute (VCO_2)
- Sauerstoffaufnahme in Millilitern pro Minute pro Kilogramm Körpergewicht ($VO_2/kgKG$)
- Respiratorischer Quotient als CO_2 -Abgabe/ O_2 -Aufnahme (RQ)

Vor jeder Untersuchung erfolgte eine komplette Eichung des Systems (Raumluft-, Verzögerungs-, Gas- und Volumenkalibrierung).

2.3.5 Laktatmessung

Zur Bestimmung der Laktatkonzentration wurde eine kapillare Blutentnahme am Ohrläppchen durchgeführt. Dazu wurde mit einer Einmallingzette in das Ohrläppchen gestochen. Es wurden 20µl Blut mit geeichten Glas-Einmal-Mikropipetten der Firma EKF-diagnostik GmbH (Barleben, Deutschland) entnommen. Diese wurden in Reaktionsgefäßen mit 0,2 ml Laktat-Hämolyselösung (EKF) manuell vermischt und am gleichen Tag analysiert. Die Bestimmung der Laktatwerte erfolgte mit einem „BIOSEN C_line“[®] Analysegerät der Firma EKF-diagnostic GmbH (Barleben, Deutschland) (Abb. 11) nach dem enzymatisch-amperometrischen Messprinzip. Hierbei wandeln EKF-Chipsensoren die Probenkonzentration aus Laktat in auswertbare, digitale Informationen um. Zur Qualitätskontrolle der Kalibrierungen wurden Kontrolllösungen mit definierter Laktatkonzentration in dafür gebrauchsfertige Reaktionsgefäße gefüllt und analysiert.



Abbildung 11: Laktatanalysegerät „BIOSEN C_line“[®] der Firma EKF-diagnostic GmbH mit portablem Drucker und Laktatprobenhalter.

2.3.6 Herzfrequenzmessung

Die Messung der Herzfrequenz während des Tests erfolgte mittels eines batteriebetriebenen Herzfrequenzmessgerätes der Firma POLAR (Kempele, Finnland), Typ S710i. Dieses Gerät besteht aus einem Sender in Form eines

Brustgurt und einer Armbanduhr als Empfänger. Über die an dem Sender befindlichen Elektroden werden EKG-genaue Signale der elektrischen Herzaktion telemetrisch auf den Empfänger übertragen und dort angezeigt.

2.4 Muskelbiopsie und Histologie

Jeder Teilnehmer der Studie unterzog sich einer Muskelbiopsie am rechten musculus vastus lateralis. Vor dem Eingriff wurde jeder Proband mündlich und schriftlich über Risiken und mögliche Komplikationen aufgeklärt und musste eine Einverständniserklärung unterschreiben.

2.4.1 Biospietechnik

Die Muskelbiopsie erfolgte durch eine so genannte Biopsienadel (Abb.12), bei der es sich um eine Hohnadel (A,D) mit einer Aussparung am unteren Ende, sowie einer Schneideeinheit (B) im Inneren handelt, wie sie erstmals von Bergström (1962) verwendet wurde. Mit einem weiteren Zylinder (C) kann das entnommene Gewebe aus dem Stanzzylinder (B) heraus geschoben werden.

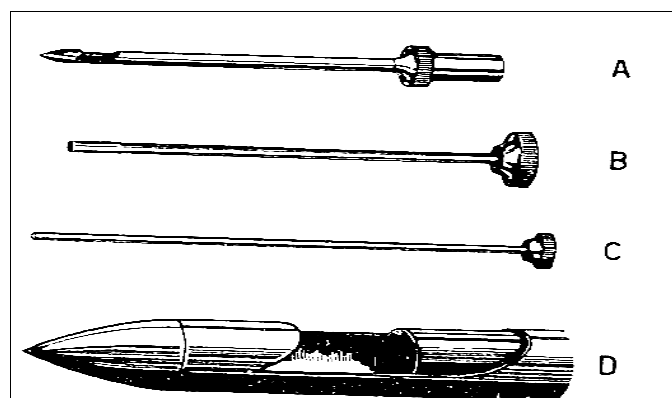


Abbildung 12: Muskel-Biopsienadel nach BERGSTRÖM (1975)

Zusätzlich wurde über einen Latexschlauch eine Kunststoffspritze verbunden, mit der ein Unterdruck in der Nadel erzeugt werden kann (Abb. 13). Diese

Modifizierung der Biopsienadel, die der Vergrößerung der Biopsieentnahmemenge dient, wurde erstmals von EVANS et al. (1982) vorgestellt. Mit dieser Technik ist es möglich, zwischen 65-78 mg Muskelgewebe zu entnehmen (EVANS et al. 1982).

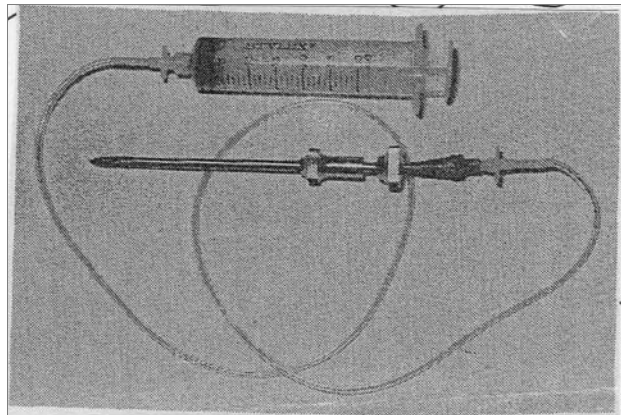


Abbildung 13: Modifizierte Biopsienadel (EVANS 1982)

Nachdem das Gebiet der Entnahmestelle sterilisiert wurde, erfolgte die Lokalanästhesie durch eine Lösung aus Xylocain und Adrenalin. Nach Wirkungseintritt wurde mit dem Skalpell sowohl die Haut als auch die Muskelfascie des M. vastus lateralis um ca. 1,5 cm geöffnet und anschließend die Aussparung am unteren Ende der Hohlneedle durch die Inzisionsstelle in direkten Kontakt mit dem Muskelgewebe gebracht. Das durch den erzeugten Unterdruck der Spritze in die Aussparung der Biopsienadel gesaugte Muskelgewebe wurde anschließend durch manuelles Herunterdrücken der Schneideeinheit vom restlichen Muskel getrennt und entnommen. Im Anschluss an die Biopsie wurde die Wunde mit einem Klammerpflaster adaptiert und ein steriler Wundverband sowie ein Kompressionsverband für 24 Stunden angelegt.

2.4.2 Verarbeitung des Gewebes

Um enzymatische Reaktionen möglichst gering zu halten, wurden die Biopsien nach der Entnahme schnellstmöglich konserviert. Hierzu musste das Gewebe

aufgrund der geplanten Untersuchungen gedrittelt und danach auf verschiedene Weise weiter behandelt werden. Proben, die auf RNA Ebene untersucht werden sollten, wurden direkt in Stickstoff auf -180°C eingefroren. Das zweite Drittel des entnommenen Gewebes, wurde zuerst in Tissue Tek (Sakura, NL), anschließend in Isopenthan (80°C) und zum Schluss ebenfalls in Stickstoff heruntergekühlt und sollte der Anfertigung von Schnitten am Kryostaten dienen. Um das Muskelgewebe in Paraffin einbetten und anschließend schneiden zu können, wurde es beginnend mit einer 4%igen Formollösung und anschließender, aufsteigender Alkoholreihe bis zu 100% Ethanol dehydriert. Zur Fixierung wurde das dehydrierte Muskelgewebe im folgenden Schritt mit 60°C warmen Paraffin in einem Einbettautomaten (MILES SCIENTIFIC: Tissue Tek VIP 2000, Tokio, Japan) durchtränkt.

2.4.3 ATPase Färbung

Über die Färbung der spezifischen Isoformen der Myosin Adenosintri-phosphatase (ATPase) kann durch die Unterscheidung der Myosinschwerketten (MHC) eine Muskelfasertypisierung, nach der Methode von BROOK und KAISER (1970) vorgenommen werden. Ursächlich für den Nachweis ist das faserspezifische Enzym Myosin-Adenosin-tri-phosphatase, welches direkt an der elektro-mechanischen Kopplung während des Kontraktionsvorganges der Skelettmuskulatur beteiligt ist. Es befindet sich an den Kopfreionen der schweren Ketten des Myosinfilamentes. Von ihm wird ATP in ADP und Phosphat hydrolysiert und dabei die für die Kippbewegung der Myosinköpfe benötigte Energie freigesetzt. Bei der Fasertypisierung macht man es sich zu nutze, dass es verschiedene Sub-typen der ATPase gibt, die in ihrer Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten gehemmt werden. Dadurch kann man säurestabile von alkalischstabilen Formen der ATPase unterscheiden. Bei einem pH-Wert von 9,4 konnten BROOK und KAISER (1970) zwei Muskelfasertypen unterscheiden. Typ I, dessen ATPase weniger aktiv ist, wird dunkler gefärbt als Typ II. Eine vorgeschaltete saure Inkubation bei pH 4,5 bewirkt, dass die säurestabileren ATPase-Formen relativ dunkel (Typ I) und die

weniger säurestabilen (Typ II) entsprechend heller gefärbt werden, wobei sich die Typ II Fasern unter diesen Bedingungen nicht einheitlich verhalten, sondern sich hell gefärbte Typ IIa von etwas dunkleren Typ IIx Fasern unterscheiden lassen (Abb. 14).

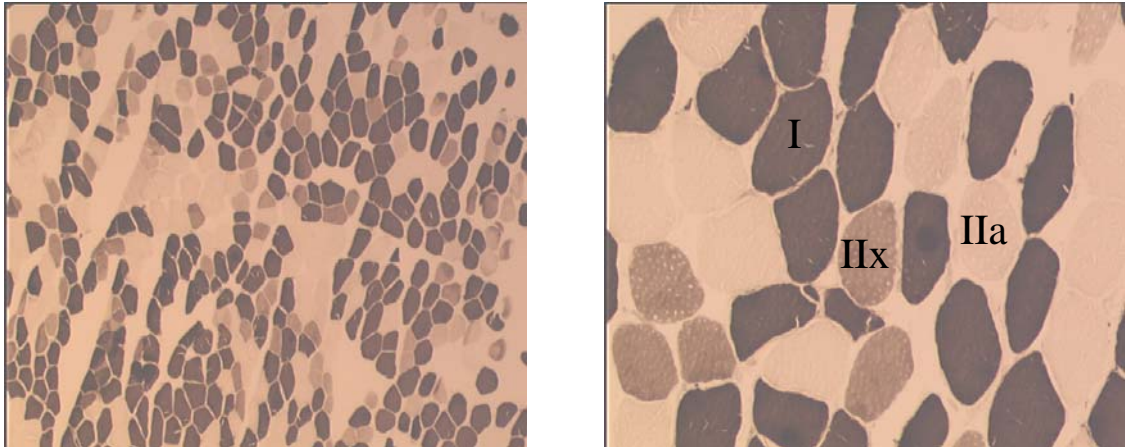


Abbildung 14: ATPase Färbung dieser Arbeit nach MABUCHI/SRETER (1980). Vorinkubation mit pH 4,5. Weiß: Typ IIa, Schwarz: Typ I und intermediär Typ IIx

Generell muss dazu gesagt werden, dass durch Mikroschnitte und Faseranalyse gezeigt werden konnte, dass sich das Isoformenspektrum von Myosin nicht streng an die histochemische Klassifikation der Fasertypen nach der ATPase Reaktion hält, d.h. auch eine Heterogenität der Myosin-Isoformen in Einzelfasern besteht. Eine Einzelfaser, die nach der ATPase Färbung als I, IIa oder IIx klassifiziert wird, enthält also eine oder mehrere MHC-Isoformen und die Summe aller bio-chemischer Eigenschaften ergibt dann den histochemischen Fasertyp (STEINACKER et al. 2002).

2.4.4 Behandlung der Muskelfaserschnitte

Für das Verfahren wurden folgende spezifische Lösungen hergestellt, bei denen sich der pH-Wert als sehr sensibel herausstellte und die Kalibrierung somit äußerst exakt erfolgen musste.

1. Saurer vorinkubations Buffer:

In 250ml mQ-Wasser: 1,95g Natriumacetat (0,01M) and 1,85g Kaliumchlorid (0,01M)

2. Waschbuffer:

In 1L mQ-Wasser: 12,01g TRIS (0,01M) and 2,60g Kalziumchlorid (0,015 M).

Kalibrierung mit Salzsäure auf pH 7,8

3. Glycin Buffer (frisch ansetzen)

In 200ml mQ-Wasser: 0,79g Glycin, 0,84g Kalziumchlorid, 0,76g Natriumchlorid and 0,38g Natriumhydroxid

4. ATP Inkubationslösung (frisch ansetzen)

In 200 ml Glycin Buffer (3) 340mg ATP lösen

Kalibrierung mit Salzsäure auf pH 9,4

5. 1% Kalziumchloride Lösung

In 200 ml mQ-Wasser 2g Kalziumchlorid lösen

6. 1% Kobaltchloride Lösung

In 200 ml mQ-Wasser 2g Kobaltchlorid lösen

7. 1% Ammoniumsulfid Lösung (frisch ansetzen):

In 200 ml mQ-Wasser 2 ml Ammoniumsulfid lösen

Zu Beginn der ATPase Färbung werden die Objektträger für 45 Sekunden bei pH 4,5 (1) vorinkubiert, danach dreimal für eine Minute mit dem Waschbuffer (2) behandelt und dreimalig mit destilliertem Wasser gespült. Dann werden die Schnitte für 25 Minuten in die Inkubationslösung mit pH 9,4 (4) gelegt. Zur weiteren Behandlung werden die Proben dreimal kurz in Kalziumchlorid (5) eingetaucht, danach nochmals ausgespült um schließlich für drei Minuten .in Kobaltchlorid (6) zu inkubieren. Es folgen drei weitere Spülungen und anschließend die Färbung in Ammoniumsulfid (7). Vor der abschließenden Alkoholreihe mit 50%, 70%, 96%, 100% und 100% Xylol werden die Objektträger ein letztes Mal gewaschen.

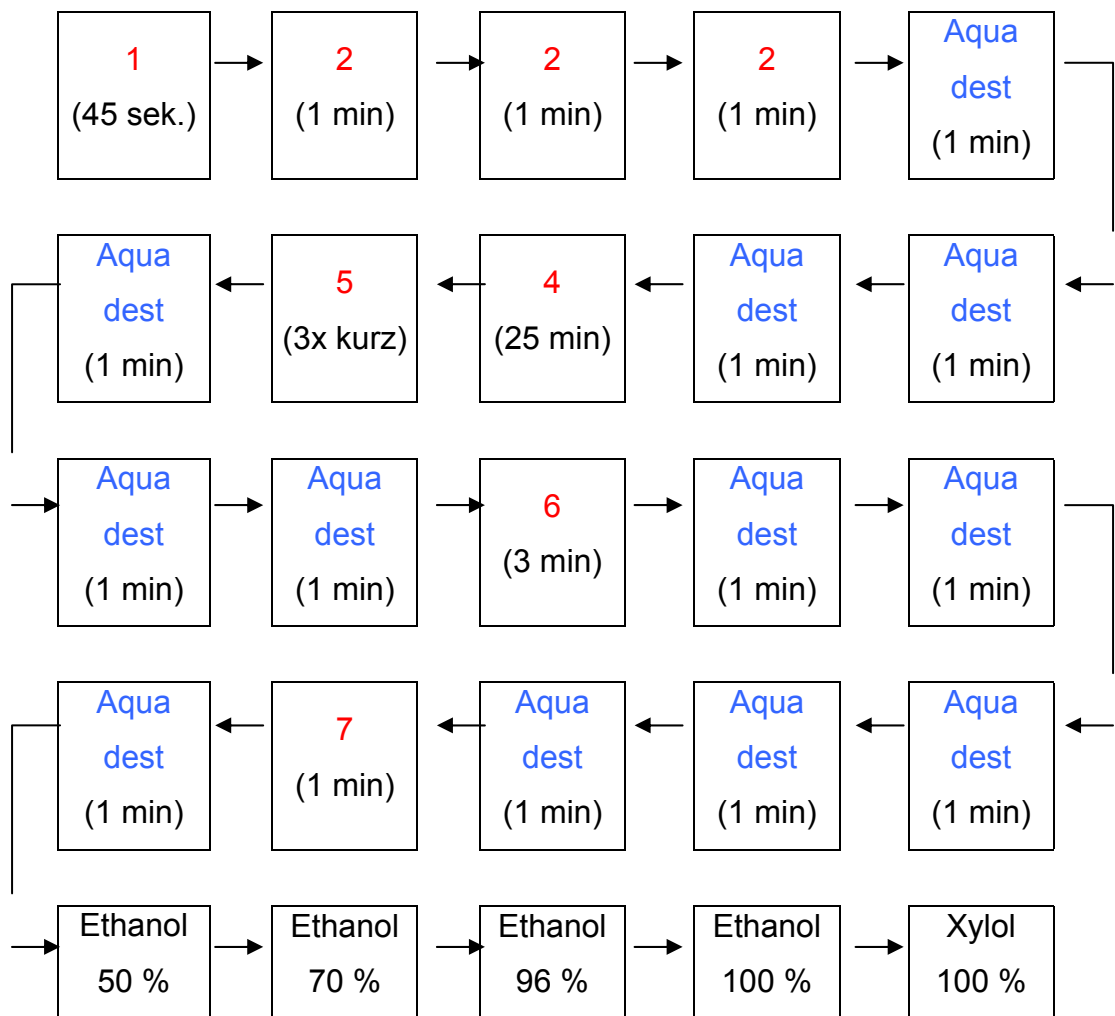


Abbildung 15: Behandlungsprotokoll zur ATPase Färbung

2.4.5 Auswertung ATPase- Färbung

Zur Auswertung der Muskelfasern wurden die Objektträger unter dem Bright-Field Mikroskop der Firma Zeiss (Axiophot Hbo50, Jena) mit einer zehnfachen Vergrößerung abgelichtet. Eine einheitliche Vergrößerung der Querschnitte wurde gewählt, um die Areale in ihrer Fläche zu standardisieren und den Querschnitt einheitlich bestimmen zu können. Die jeweils fünf Aufnahmen, die pro Biopsie mindestens 100 Zellen beinhalten sollten, wurden in das Softwareprogramm (KS 300 3.0, Zeiss, Jena) eingelesen und zur Analyse in das Programm (Scion Image for Windows, Scion Corporation, Maryland USA) importiert. Durch dieses Programm konnte sowohl die mittlere Helligkeit der

jeweiligen Muskelfaser als auch deren Fläche sowie der Muskelfaserquerschnitt bestimmt werden. Zur Muskelfasertypisierung wurden die Fasern in den einzelnen Aufnahmen nach ihrem jeweiligen Farbspektrum, „schwarz“ (Typ I), „grau“ (Typ IIx) und „weiss“ (Typ IIa) ausgezählt. Die Einteilung erfolgte dabei durch die Einschätzung des Untersuchers. Zur Vermessung der Muskelfasern verwenden viele Studien die so genannte „Cross sectional Area“, bei der es sich um die komplette Fläche der einzelnen Fasern handelt. Da dieser Wert sehr anfällig für unvermeidbare Variationen im Schnittwinkel ist, wurde er in dieser Arbeit nicht verwendet. Das angewendete Softwareprogramm maß für jede Muskelfaser den so genannten „skeletal muscle diameter“ und legte für diese exaktere Bestimmung einer Querschnittsveränderung durch jede Muskelzelle die längstmögliche Achse, sowie die dazu längste, rechtwinklig liegende Gerade, die als schnittwinkelunabhängiger Muskelfaserquerschnitt gewertet werden kann (Abb. 16). Der Durchmesser wurde dabei in Mikrometern vermessen.

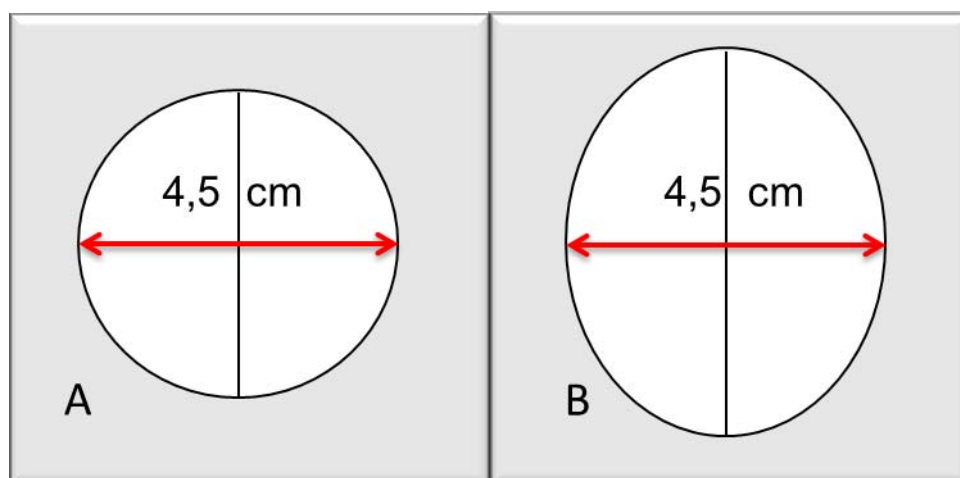


Abbildung 16: Muskelfaserquerschnittbestimmung

Der Kreis (A) symbolisiert eine Muskelfaser, die exakt im Schnittwinkel von 90° geschnitten wurde. Die Ellipse (B) stellt das Ergebnis eines von 90° abweichenden Schnittwinkels dar. Obwohl die Fläche der beiden Fasern (A,B) stark variiert, und somit die „Cross sectional Area“ das Ergebnis verfälschen würde, gibt die auf der längsten Achse rechtwinklig liegende längste Gerade, der „skeletal myocyte diameter“, den Querschnitt, der bei A und B gleich ist, verlässlich an, und schaltet den Einfluss des Schnittwinkels aus.

2.5 m-RNA Analyse

2.5.1 RNA-Isolation

Das Ziel der RNA-Präparation ist es, die Ribonukleinsäure aus den zuvor präparierten Muskelzellen zu isolieren. Das zu untersuchende Gewebe wurde in flüssigen Stickstoff gegeben, damit es während der Präparation nicht auftaut. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Mörsers oder Hammers zerkleinert. Davon wurden 70-90 mg abgewogen und in ein Teflon-Gefäß gelegt. Das Gefäß wurde verschraubt und für 30-40 s in einen Dismembrator (Firma: Braun) gespannt, in dem das Gewebe mit einer Stahlkugel homogenisiert wurde. Danach wurde zu dem Gewebe 1000 µl Trizol® (Firma: Invitrogen) gegeben. Trizol® hat die Aufgabe, die Zellmembranen aufzubrechen. Die Inkubationszeit betrug bei Raumtemperatur ca. 5 min bis das Trizol®-Gewebe gemischt war. Die Zellen wurden mit einer 5 ml Spritze plus Kanüle suspendiert und anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Volumen 2 ml) überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß von Hand 15x umgedreht und anschließend bei Raumtemperatur 2-3 min inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation (15 min, 2-8°C, 12000 x g, „Centrifuge 5417 R“ der Firma Eppendorf) wurden Polysaccharide, extrazelluläre Membranen und hochmolekulare DNA abgetrennt. Durch das Zentrifugieren erhielt man drei Schichten in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen: die oberste Schicht mit der wässrigen Phase, welche die RNA enthält. Diese wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die übrigen zwei Schichten wurden verworfen. Die RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol in einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine Zentrifugierung für 10 min bei 2-8°C und 12000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt, um ihn später auf das RNA-Gel aufzutragen. Das RNA-Pellet wurde mit 1000 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 2-8 °C und 7500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 15-20 min bei Raumtemperatur im Eppendorf-Reaktionsgefäß

getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Pellet je nach Größe in 30 bis 50 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Wasser resuspendiert. Wurde die RNA Konzentration nicht sofort bestimmt, so konnte das Eppendorf-Reaktionsgefäß bei - 80° eingefroren werde; dies konnte zum weiteren Lösen des Pellets beitragen (Friedel, 2006).

RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Präparation von RNA aus Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt und anschließend 1 ml Trizol® in eine Zellkulturflasche gegeben. Nach einer Einwirkzeit von ca. 3 - 5 min wurde das Trizol mit den Zellen abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Präparation der RNA erfolgt wie oben beschrieben.

2.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach dem Kalibrieren des Spektrophotometers (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) mit DEPC-Wasser konnte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades in Quarzglasküvetten erfolgen. Dafür wurden die Proben im jeweiligen Aufnahmepuffer (hier: DEPC) 1:1000 verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient aus den Absorptionen gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der RNA und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Erhebliche Schwankungen der Messungen könnten auf eine nicht vollständig gelöste RNA hinweisen. Um visuell die Qualität der RNA zu überprüfen, wurde ein so genanntes RNA-Kontrollgel gegossen. Dazu wurden 1-3 µg RNA mit 2 µl 40%iger Succroslösung und Farbstoffen (Saccharose, Bromphenolblau, Xylencyanol) versetzt, mit TAE-Puffer auf insgesamt 12 µl aufgefüllt und auf ein 2%iges Agarosegel, das mit Ethidiumbromid (EtBr) [0,3 µg/ml] vermischt ist, aufgetragen. In einer Gelkammer der Firma Biometra wurde die RNA bei einer Spannung von 75V in 1×TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Außer der RNA wurde auch ein Größenstandard als Marker und die Isopropanolproben aufgetragen. Unter

ultraviolettem Licht wurde die 28S und 18S Bande der ribosomalen RNA sichtbar gemacht. An der Stelle, an der das Isopropanol aufgetragen wurde, sollten möglichst auf dem Bild keine Banden zu erkennen sein. Lassen sich trotzdem Banden erkennen, so war dies ein Indiz dafür, dass sich noch ein Rest der RNA in diesem Teil der Lösung befand und nicht die gesamte RNA vollständig gefällt wurde. Anhand des Bandenmusters und der Bandenintensität kann man eine eventuelle Degradierung der RNA und Konzentrationsunterschiede in den einzelnen RNA-Proben erkannt werden.

2.5.3 DNase-Verdau

Da es bei der RNA-Präparation mittels Trizol® häufig zu DNA Kontaminationen kommt, musste die RNA-Probe in einer Test-PCR auf ihren DNA-Gehalt untersucht werden. Hierbei wurde in einer PCR statt cDNA 1 µl RNA-Mix pipettiert. Die Primer des Kontrollgens Cyclophilin (Cyc) wurden als interner Standard verwendet. Sollte eine DNA-Kontamination vorhanden sein, so erkennt man diese an einem 212 bp (Basenpaare) großen Amplikon. Bei einer Amplifikation und somit einem Signal auf dem 2%igen Agarosegel befand sich DNA in der RNA-Probe (Friedel 2006). Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, sollte diese dann durch einen DNA-Verdau mit Hilfe von Desoxyribonuklease I abgebaut werden. Der bei der DNA-Kontamination erforderliche DNase-Verdau (Firma Invitrogen) setzte sich wie folgt zusammen:

3µg RNA

1µl DNase Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 20 mM MgCl₂; 500mM KCl

1µl DNase I [1U/µl]

Dieser Ansatz wird mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert (Friedel 2006). Die DNase wurde durch die Zugabe von 1 µl 25mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und die Erwärmung auf 65°C für 5min im Thermocycler der Firma Perkin Elmer

inaktiviert. Dieser Reaktionsansatz konnte sofort für die cDNA-Synthese eingesetzt werden.

2.5.4 cDNA Synthese

Das Umschreiben von RNA in DNA, also die Synthese von cDNA ist ein fundamentaler Ausgangspunkt, um die Sequenzen von Transkripten zu klonen und zu sequenzieren oder in der PCR zu amplifizieren. Bei der Synthese der cDNA nutzt man eine charakteristische Eigenschaft von eukaryontischen mRNAs - nämlich die Aneinanderreihung von Adeninresten am 3'-Ende der mRNA. Dies geschieht mit Hilfe eines so genannten oligo(dT)-Primers, der ein Oligonukleotid aus Desoxythymidin-Nukleotiden darstellt und der komplementär an das poly(A)-Ende der mRNA bindet. Für die cDNA-Synthese wurde das SUPERSCRIPT IITM Preamplification System der Firma Invitrogen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden oligo(dT)-Primer verwendet, um die cDNA Synthese durchzuführen. Oligo(dT)-Primer sind spezifische Primer, die nur mRNA in cDNA umschreiben, da sie an die 3'-poly(A)-Enden der mRNA binden. Für die Synthese wurden – je nach vorhandener Menge – 3-5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurde 1 µl oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) gegeben und mit DEPC-H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C inkubiert und für 1 min auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurden je Probe 7 µl Reaktionspuffer zugegeben. Reaktionspuffer pro Ansatz 2 µl 10 x RT Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl) 2 µl 25 mM MgCl₂ (Magnesiumchlorid) 1 µl 10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2 µl 0,1 M DTT (Dithiothreitol) 7 µl Gesamtmenge Die Erst-Strang-Synthese wird mit Hilfe des oligo(dT)-Primers durchgeführt. Als nächstes werden die Proben 5 min auf 42°C erhitzt, so dass sich die Primer anlagern können. Anschließend werden 0,8 µl Superscript™ II RT (200 U) zu jeder Probe hinzugefügt. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgt bei 42°C für 50 min. Weiterhin werden die Reaktionsansätze für 15 min auf 70°C erhitzt, um die Synthese zu beenden. Durch Zugabe von 0,8 µl RNase H und einer Inkubation

bei 37°C für 20 min erfolgt der Abbau der mRNA-Matrize. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgt bei –20°C (Friedel 2006).

2.5.5 Primer

Die verwendeten Primer werden aus der cDNA-Sequenz der entsprechenden Gene abgeleitet. Die Sequenzinformationen stammen aus der EMBL-Genbank. Bei der Auswahl der Primer werden folgende Aspekte berücksichtigt:

1. Die Länge der Primer sollte ungefähr 20-25 Basenpaare betragen; weniger als 18 bp und mehr als 25 bp führen zu schlechteren Ergebnissen.
2. Die Bindungsstelle sollte möglichst nahe am 3'-Ende (nach Möglichkeit eine G- oder C-Base) des Gens liegen, da in der cDNA-Synthese polyd(T)-Primer verwendet werden.
3. Das 3'-Ende sollte stärker hybridisieren als das 5'-Ende, und deshalb sollten mehrere T-Basen am 3'-Ende vermieden werden.
4. Das Verhältnis von Guanin und Cytosin zu Adenin und Thymin in den Nukleotiden sollte ungefähr 1:1 betragen.
5. Die Primer sollten möglichst keine repetitiven Sequenzen, d.h. Cluster (mehr als 3 oder 4 Basen, v.a. von Guanin) enthalten.
6. Primer dürfen keine sich selbst komplementierenden Sequenzen (Palindrome) aufweisen und die Schmelztemperatur sollte zwischen 55-70 °C liegen.
7. Es sollte überprüft werden, ob die Primer-Sequenz ausschließlich auf eine Stelle im „Template“ passt („Insert“).
8. Der Abstand der forward- und reverse-Primer (sense- und antisense-Primer) und damit die Länge des Amplikons sollte zwischen 200 und 400 bp betragen.
9. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die Primer werden in sterilem Wasser

(Ampuwa®) der Firma Fresenius gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt.

Die Sequenzen sind im Folgenden beschrieben:

Primer Fragmentlänge

Cyclophilin (212 bp)

forward 5'- GGA TTC ATG TGC CAG GGT GG -3'

reverse 5'- CAC ATG CTT GCC ATC CAG CC -3'

Myostatin (225 bp)

forward 5'- TAA CCT TCC CAG GAC CAG GA -3'

reverse 5'- CAC TCT CCA GAG CAG TAA TT -3'

2.5.6 Das Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) ist eine chemische Methode zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragments *in vitro* aus DNA und für die heutige molekulare Genetik unentbehrlich. Eine automatisierte PCR kann nur mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase durchgeführt werden. Da beim ersten Arbeitsschritt der PCR die zu untersuchende DNA bei 94°C aufgeschmolzen wird, würde eine nicht hitzebeständige Polymerase zerstört werden und man müsste sie nach jedem Zyklus erneut zugeben. Der gesamte Reaktionszeitraum beträgt einige Stunden. Folgende Reagenzien sind zur Durchführung einer PCR nötig: cDNA, PCRPuffer, MgCl₂, dNTP's, Primer, TaqPolymerase® (Firma Invitrogen). Dieses spezifische Reaktionsgemisch wird einer zyklisch wiederkehrenden Abfolge von verschiedenen Temperaturschritten ausgesetzt. Somit erreicht man eine Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts, die sogenannte Amplifikation (Friedel 2006).

Der Zyklus einer PCR besteht aus drei unterschiedlichen Temperaturschritten:

1. Denaturierung:

Bei einer Temperatur von 94°C schmilzt die zu erweiternde doppelsträngige DNA und man erhält einzelne Stränge.

2. Annealing:

Durch ein rasches Abkühlen auf eine Temperatur von ca. 55°C wird die Vereinigung der einzelnen Stränge verhindert und die Primer (zwei unterschiedliche Oligonukleotide mit entgegengesetzter Orientierung) lagern sich an die entsprechend komplementären Strangabschnitte der Ausgangs-DNA an.

3. Elongation/Extension:

Die TaqPolymerase® verlängert bei 72°C (von dem Primer aus) den DNA-Strang durch den Einbau der dNTP's bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Diese ist mit der ursprünglichen DNA identisch und dienen im nächsten Zyklus wieder als Ausgangs-DNA. Die Zahl der Ausgangs-DNA verdoppelt sich in einem Zyklus; im Nachfolgenden erhält man die vierfache Menge, etc. So erhöht sich die Zahl der DNA theoretisch um 2^n (n = Anzahl der Zyklen). Mit der Methode der semiquantitativen PCR ist es möglich, Genregulationen auf mRNA-Ebene zu analysieren (Murphy et al., 1990; Knauthe et al., 1996). Bei diesem Verfahren wird das zu untersuchende Gen mit einem gleichzeitig amplifizierten Standard verglichen, der nicht reguliert wird.

PCR Mastermix mit TaqPolymerase® für PCR (pro Ansatz):

28,8 µl steriles *aqua bidest.* (Ampuwa®)

5 µl 10 x PCR Puffer (1 M Tris-HCl (pH 9,0); 0,4 M Ammoniumsulfat)

3 µl 50 mM MgCl₂

4 µl 2,5 mM dNTP-Mix

0,2 µl Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]

41 µl Gesamtmenge

2.5.7 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge können aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Für Auftrennungen im Bereich von 150-1000 bp eignen sich 1,5-2%ige Agarosegele. Wird an eine Gelmatrix eine Spannung angelegt, wandern die Moleküle abhängig von Größe und Ladung mit konstanter Geschwindigkeit zur Anode oder Kathode. Kleinere Moleküle können schneller die Gelporen passieren als größere. Die Agarose wird in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 1xTAEPuffer in der Mikrowelle zum Kochen (100°C) gebracht, bis sich die Agarose schlierenfrei aufgelöst hat. Bei dem Erkalten der Lösung, d.h. sobald sie ca. 50°C erreicht hat, wird sie mit EtBr (0,3 µg/ml) versetzt. EtBr lagert sich zwischen den Basenpaaren ein (interkaliert) und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht. Nukleinsäuren lassen sich so durch EtBr sichtbar machen. Als nächstes wird die Gellösung in eine vorbereitete Laufkammer gegossen und ein Kamm (zum Formen von Taschen) eingefügt. Dann wird die Lösung bis zum Erstarren ca. 15 min stehen gelassen. Anschließend wird der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1xTAELaufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Die Proben, die mit 10 µl Ladepuffer (Succrose und Farbstoffe) versetzt sind, können nun in die Taschen pipettiert werden. Als Längenstandard wird ein 100 bp Größenstandard (Firma: Invitrogen) verwendet, um die Länge der Fragmente bestimmen zu können. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 75-90 V in einer Gelkammer der Firma Biometra. Nachdem die Farbfront ca. 7-8 cm gelaufen ist, wird der Vorgang gestoppt.

Die Analysegele werden unter UV-Licht mit einer elektronischen Bildverarbeitungsanlage der Firma MWG aufgenommen. Die Speicherung der Bilder, in einem für Computer üblichen Format (tif-Datei), ermöglicht die weitere Bearbeitung mit speziellen Auswertungsprogrammen (Zero Scan).

2.5.8 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT (reverse transkription)-PCR ist die modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Es existieren verschiedene Nachweismethoden für die real time PCR; eine davon ist der unspezifische Einbau des Farbstoffs SYBR Green (Firma Bio-Rad) in doppelsträngige DNA. SYBR Green ist ein interkalierender Farbstoff und ermöglicht einen sensitiven Amplifikationsnachweis. Ein Vorteil der Real-Time-RT-PCR ist, dass der Amplifikationsprozess in Real-Time verfolgt werden kann. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit genauer zu quantifizieren als bei konventionellen PCR Verfahren. Die Untersuchungen wurden in einem iCycler® IQ der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt. Dieses PCR-System ist fähig, einen Fluoreszenzanstieg während der exponentiellen Phase der PCR zu messen und ermöglicht so eine exakte Darstellung der Kinetik ab dem ersten Zyklus. Zur Auswertung wird die iCycler® IQ Real Time Detection Software V 2.1. verwendet. Basis für die quantitative Auswertung der Real-Time PCR Daten ist der sogenannte „Threshold Cycle“ (CT). Der „Threshold Cycle“ ist der Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über ihre Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt. Er ist ein zuverlässiger Indikator für die ursprüngliche Kopienzahl. Nach dem exponentiellen Anstieg der Kurve erreichen alle PCR-Verläufe ein Plateau. Ab diesem Zeitpunkt (ca. 35 Zyklen) erfolgt keine PCR-Produktbildung mehr. Bei der Untersuchung wurde für jede PCR-Reaktion der jeweilige CT ermittelt. In der quantitativen Analyse wurde der CT des zu untersuchenden Gens mit einem Referenzgen abgeglichen. Um den mRNA Gehalt eines spezifischen Gens gegen ein Referenzgen zu vereinheitlichen, werden die ΔCT Werte nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\Delta CT = CT (\text{Experimentgen}) - CT (\text{Referenzgen})$$

Das Prinzip der Real-Time PCR wird in der folgenden Abbildung verdeutlicht:

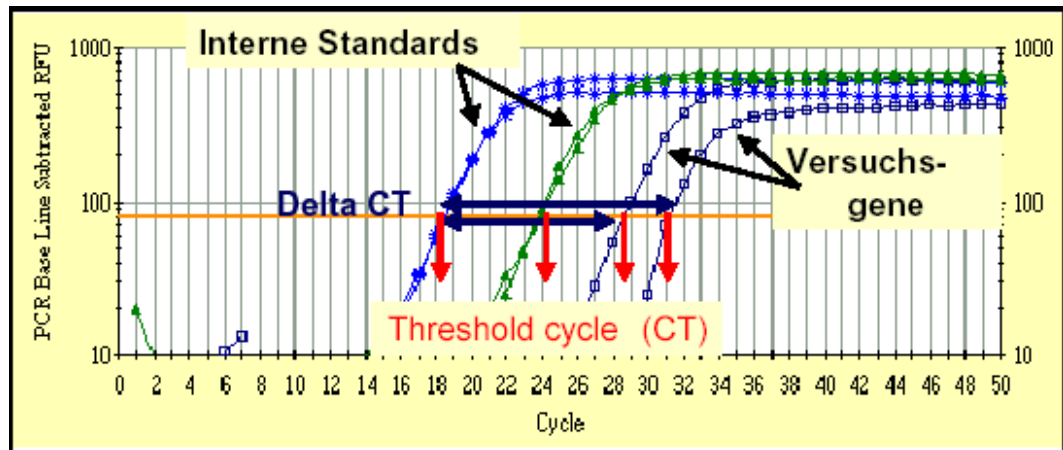


Abbildung 17: Das Prinzip der Real-Time PCR

Um die Regulation eines einzelnen Gens zu ermitteln, wird der $\Delta\Delta CT$ Wert kalkuliert. Die folgende Gleichung stellt die Berechnung dar:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{GenGehalt der Trainingsgruppe}) - \Delta CT (\text{GenGehalt der Kontrollgruppe})$$

Die Signifikanz wurde anhand der ermittelten $\Delta\Delta CT$ Werte berechnet. Um eine „Fold Induction“ zu berechnen, wird die folgende Gleichung benutzt:

$$\text{Fold Induction} = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

Für jede Probe wurden mindestens drei PCR-Läufe von unterschiedlichen cDNA-Synthesen durchgeführt. Die Fehlerbalken der $\Delta\Delta CT$ Werte zeigen die Reproduzierbarkeit der Daten. Um die Qualität und Reinheit der jeweiligen PCR-Produkte zu kontrollieren, wurde eine individuelle Schmelzkurvenanalyse verwendet. Bei der Verwendung von SYBR Green kann ein Fluoreszenzanstieg durch Primer-Dimere verursacht werden. Eine Differenzierung zwischen den spezifischen und den unspezifischen Produkten kann mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen und so zu sicheren Ergebnissen beitragen (Friedel, 2006).

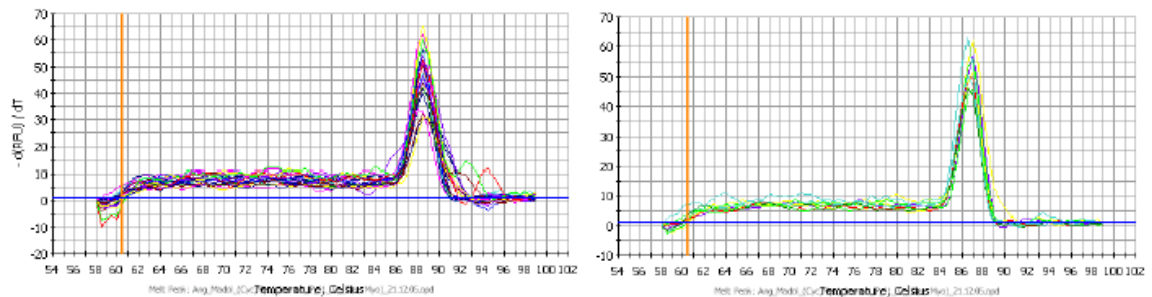


Abbildung 18: Die Darstellung eines originalen Computerdiagramms des iCycler® IQ Real Time Detection Software V 2.1 zeigt eine Abbildung der Schmelzkurve von Cyclophilin (links) und Myostatin (rechts).

Die mit SYBR Green markierten PCR-Produkte werden nach Erhöhung der Temperatur kontinuierlich aufgeschmolzen.

Die damit einhergehende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet (Steuerwald et al., 1999). Kleinere Fragmente weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf, so dass sie von den PCR-Produkten unterschieden werden können. Das optische Modul der Real Time PCR ermöglicht es, 96 Proben gleichzeitig zu untersuchen.

PCR Mastermix mit TaqPolymerase® für Real Time PCR (pro Ansatz):

22,55µl	steriles <i>aqua bidest.</i> (Ampuwa®)
5µl	10x PCR Puffer (1M Tris-HCl (pH 9,0); 0,4M Ammoniumsulfat)
3µl	50mM MgCl ₂
4µl	2,5mM dNTP-Mix
0,2µl	Taq DNA-Polymerase [5U/µl]
1,25µl	Fluorescein
5µl	SYBR® Green I
41µl	Gesamtmenge

2.6 Immunohistochemie und PCNA Färbung

2.6.1 Einbettung in Paraffin und Schnitt am Mikrotom

Nach der Konservierung des Muskelgewebes, wurde das Gewebe an der Ausgießstation, dem Tissue-Tek-Embedding-Center (MADAUS, Köln) in Paraffin eingebettet. Zur Durchführung der Immunohistochemie wurden Querschnitte der preparierten Muskulatur benötigt, so dass es wichtig war auf die entsprechende Ausrichtung der Muskelfasern zu achten. Die Biopsieproben des M. vastus lateralis wurden senkrecht in die Ausgießförmchen (POLISCIENCES, Warrington, USA) gestellt, und beim ausgießen mit Paraffin manuell mit einer Pinzette fixiert. Beim Ausgießen muss darauf geachtet werden, dass keine Luftbläschen das Gewebe umgeben, um eine Ebene Schnittfläche zu erhalten. Zum schnelleren Aushärten wurden die Förmchen auf eine Kühlplatte gestellt. Die Beschaffenheit der Ausgießförmchen ermöglicht die direkte Weiterverarbeitung der Paraffinblöcke nach ihrer Aushärtung. Sie konnten im nächsten Arbeitsschritt direkt am Mikrotom geschnitten werden. In Paraffin eingebettetes Muskelgewebe ist bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar. Um optimale Schnitte aus den Paraffinblöcken zu erhalten wurden sie auf der Kühlplatte der Ausgießstation für mindestens 20 Minuten auf ca. -5°C abgekühlt. Im nächsten Schritt wurden die Paraffinblöcke im Rotationsmikrotom 1140 Autocut (Reichert-Jung, heute: Leica Microsystems Nussloch GmbH, Bad Camberg) in $9\ \mu\text{m}$ dicke Serienschnitte geschnitten. Die variabel einstellbare Schnittdicke liegt zwischen 0 und $35\ \mu\text{m}$ pro Umdrehung. Präparat und Schnittmesser sind bei diesem Präzisionsgerät beweglich gegeneinander eingespannt. Durch gleichmäßiges Drehen an der Kurbel an der Seite des Mikrotoms wurde zunächst die obere Schicht Paraffin entfernt, bis eine gleichmäßige und ebene Schnittfläche über dem Präparat entstanden war. Nun konnten saubere Serienschnitte angefertigt werden. Diese Serienschnitte wurden wegen besserem Kontrast auf einer schwarzen Pappe auf die Qualität des im Paraffin enthaltenen Gewebes untersucht. Anschließend wurden die Schnitte zum Ausglätten ins Wärmebad (GERHARD, Königswinter) gegeben.

Beim Aufziehen auf die Objektträger war genau zu beachten, dass der erste Schnitt der Serie auf den vorher beschrifteten Objektträger für die PCNA-Färbung gezogen wurde und der zweite auf den Träger für die HE-Färbung. So konnte gewährleistet werden, dass die auszuwertenden Areale möglichst eng aneinander liegen. Der dritte Schnitt wurde wiederum als Negativkontrolle auf die rechte Seite des Antikörper-Objektträgers gezogen. Der vierte Schnitt wurde zur Sicherheit auf dem HE-Objektträger verwertet falls bei einer Färbung Zellmaterial abschwimmen sollte. Bei den Objektträgern der Marke „Super-Frost+“ handelte es sich um geputzte, geschliffene 25x75x1mm große Objektträger mit haftunterstützender Oberfläche und einem mattierten Schriftfeld (Menzel-Gläser, Hilden). Die empfindlichen 9µm dicken Paraffinschnitte wurden mit einem Skalpell und einer geeigneten Pinzette aus dem Wasserbad auf die Objektträger gezogen und für ca. 20 Minuten auf einer Heizplatte bei 30-35°C abgelegt. Nach dem Verdunsten des restlichen Wassers konnten die fertigen Objektträger problemlos bis zur jeweiligen Färbung in den dafür vorgesehenen Transportboxen aufgehoben werden.

2.6.2 Entparaffinieren der Schnitte

Um das fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe für ein immunhistochemisches Nachweisverfahren vorzubereiten, müssen die Gewebeschnitte vom Paraffin befreit werden. Dazu wurden die Objektträger, je nach Anzahl, in Z-form in ein Schiffchen gestellt damit ein aneinanderkleben ausgeschlossen werden konnte. Die Entparaffinierung ging durch das Eintauchen des bestückten Schiffchens in Küvetten, mit den entsprechend gefüllten Flüssigkeiten, von statten. Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der Trägheit der Flüssigkeiten, das Schiffchen mit den Objektträgern möglichst behutsam ein und ausgetaucht wird um das Gewebe nicht abzuspülen. Das Protokoll sah eine Dauer von insgesamt 70 Minuten beim Verwenden folgender Zeiten und Substanzen vor. Das Xylol befreit das Gewebe vom Paraffin indem es das Paraffin auflöst und verdrängt. Die anschließende absteigende Alkoholreihe dient zum Auswaschen des Xylols aus dem Gewebe und die

Annäherung an das Milieu von Wasser (H₂O). Die Schnitte waren anschließend vom Paraffin befreit und wären eigentlich in der Glasküvette über Nacht haltbar. Es wurde sich jedoch um eine zügige Weiterbearbeitung bemüht um den Gewebeverlust möglichst gering zu halten.

2.6.3 Immunhistochemie

Für den immunhistochemischen Nachweis von teilungsaktiven Satellitenzellen wurde ein monoklonaler Maus Antikörper (Monoclonal Mouse Anti- Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC 10, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) so wie ein biotinylierter, polyklonaler Antikörper (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobolins/ Biotinylated, DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark) verwendet. Polyklonale Antikörperpräparationen sind heterogen und enthalten Antikörper gegen unterschiedliche Determinanten des Antigens. Sie haben den Nachteil eventueller unerwünschter Immunreaktionen mit falsch positivem Ergebnis (z.B. durch Kreuzreaktionen), aber den Vorteil, dass durch die Erkennung unterschiedlicher antigener Determinanten die Reaktivität der Antikörper und die Empfindlichkeit der Methode gesteigert werden. Monoklonale Antikörper hingegen sind nur gegen eine antigene Determinante gerichtet und somit sehr spezifisch. Sie haben aber den Nachteil geringer Sensitivität und Stabilität. Auch Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen (damit falsch positive Ergebnisse) sind möglich, da die von monoklonalen Antikörpern erkannten antigenen Determinanten oft nur aus wenigen Aminosäuren bestehen und auch in nicht verwandten Strukturen vorkommen können (Romeis 1989). Die Funktionalität der Färbung beruht auf dem Prinzip der „indirekten Methode“ verbunden mit der „(Strept)Avidin Methode“. Bei der indirekten Methode wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. Dieser Antikörper ist gegen das zu quantifizierende Antigen (=Protein im Zellkern gerichtet). Im Zweiten Schritt wird ein Antikörper (Sekundärantikörper) aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Der Sekundärantikörper ist hier mit einem Enzym gekoppelt und sorgt für die Farbentstehung indem er eine Enzym-Substrat-

Reaktion auslöst. Die (Strept)Avidin-Methode wird als Färbemethode am häufigsten eingesetzt. Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Ein biotilylierter Meerrettich-Peroxidasekomplex bindet aufgrund dieser Affinität an dem Sekundärantikörper und verstärkt das Färbesignal.

2.6.4 HE- Färbung

Hämatoxylin ist ein Inhaltsstoff des Blauholz (*Haematoxylon campechianum*) und verwandter Arten. Er wird in der Histologie zum Färben von Zell- und Gewebestrukturen wie z. B. Mitochondrien, Zellkernen und Kollagenfasern eingesetzt. Darüber hinaus fand es in der Färberei und in der Tintenproduktion Anwendung. Er bildet farblose oder gelbliche Prismen, die in kaltem Wasser schwer, in heißem Wasser, Alkohol oder Äther leicht löslich sind. Es wird meist durch Extraktion aus Kernholz gewonnen. Dazu wird primär ein wässriger Extrakt hergestellt, der nach einer Extraktion mit Ether eingeeengt wird. Alternativ kann Hämatoxylin auch aus dem wässrigen Extrakt durch Fällung mit Harnstoff gewonnen werden. In seiner reinen Form ist Hämatoxylin farblos bis beige. Durch Oxidation mittels Luftsauerstoff oder einem geeigneten Oxidationsmittel entsteht in wässriger oder alkoholischer Lösung aus Hämatoxylin das ockerbraun gefärbte Hämatein. Dieser Vorgang wird auch als Reifung bezeichnet. Hämatein ist ein leicht saurer Farbstoff. Die gewünschte färbende Wirkung wird erst durch den Zusatz von Metall-Kationen als Beize erreicht. In Gegenwart dieser mehrwertigen Kationen bilden sich Farbstoffkomplexe durch Chelatbildung in der Stöcheometrie 1:1. Komplexe aus Hämatein und Alaunen werden dabei als Hämalaune bezeichnet. Hämalaune zeigen die typische dunkelblau-violette Farbe und werden auch als Hämatoxylinlack (eigentlich Hämateinlack) bezeichnet. Für die Herstellung von hämatoxylinhaltigen Farblösungen gibt es über 100 verschiedene Rezepte. Weit verbreitet ist die Verwendung von Hämatoxylin nach Mayer, Harris, Gill (Hämalaune) und Weigert (Eisenhämatoxylin). Diese Farblösungen enthalten basischen Farblack in saurem Milieu (pH 3-4). Dessen Anbindung erfolgt durch

mehrwertige Kationen (z.B. Nukleinsäuren des Zellkerns) an Chelat. Diese Kombination ist stabil genug um nachfolgende Spülschritte in Wasser und Alkohol zu überstehen. Bei dem niedrigen pH-Wert der Färbelösung erscheinen die gefärbten Strukturen rötlich-braun, erst durch Anheben des pH-Wertes durch Spülen in Leitungswasser (pH 6,8-7,0) entsteht die typische blau-violette Färbung. Durch Variation des pH-Wertes kann eine Selektivität für verschiedene Strukturen erreicht werden. Während bei einem pH-Wert von $> 4,5$ zahlreiche Zellstrukturen gefärbt werden, dominiert bei einem pH-Wert von 2-3 die Anfärbung von Zellkernen. In Kombination mit der Hämatoxylin-Färbung (Zellkernfärbung) wird in der Regel eine Gegenfärbung mit einem kontrastreichen Zytoplasmafarbstoff durchgeführt. Klassisch wird eine Gegenfärbung mit Eosin durchgeführt (Hämatoxylin-Eosin-Färbung), bei der z.B. Proteine angefärbt werden. Hierbei werden Zellkerne üblicherweise dunkelblau eingefärbt, während die anderen Zellbestandteile rosa bis pink erscheinen. Für Die HE-Färbung werden Hämalaune eingesetzt (Romeis 1989). Für die hier durchgeführte HE-Färbung gibt ein institutsinternes Protokoll die Dauer der einzelnen Färbeschritte vor. Zunächst wurden die Paraffinschnitte entsprechend entparaffiniert. Aus der Glasküvette mit A. dest wurde das Schiffchen für 5 Minuten in die Glasküvette mit Hämalaun getaucht. Anschließend wurde das Schiffchen in eine mit Leitungswasser gefüllte Küvette getaucht und vorsichtig mit Leitungswasser durchgespült, indem man den Wasserstrahl auf den Rand der Küvette laufen ließ. Dadurch erhält man wie oben beschrieben die typische blau-violette Farbe, warum man diesen Vorgang auch Bläuen nennt. Im nächsten Schritt wurde das Schiffchen für 2 Minuten in die mit Eosin gefüllte Küvette gestellt. Von dort durchlief das Schiffchen zunächst eine Küvette mit Aqua dest und anschließend eine verkürzte, aufsteigende Alkoholreihe. Dabei wurde jeweils einmalig 96% Alkohol, 100% Alkohol und Xylol für nicht länger als zwei Minuten angewendet. Die Objektträger wurden einzeln aus dem Xylol entnommen, mit einem Papiertuch trocken gewischt und mit Entelan und einem Deckplättchen eingedeckt. Das

gefärbte Gewebe ist so für lange Zeit konserviert, wurde aber dennoch innerhalb der nächsten 14 Tage ausgewertet um Verblässungen zu vermeiden.

2.6.5 PCNA Färbung

Begonnen wurde am ersten Tag mit der Entparaffinierung. Zuvor wurden die Schnitte für ca. 30 Minuten bei 36°C „gebacken“ um die Haftung des Gewebes am Objektträger zu verstärken. Die entparaffinierten Objektträger wurden in feuchte Kammern gelegt um späteres Verdunsten von Flüssigkeiten möglichst gering zu halten. Die jeweils zwei Gewebeproben pro Objektträger mussten gegeneinander abgegrenzt werden um sie später mit verschiedenen Substanzen behandeln zu können. Hierzu wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem hydrophoben PAP-Pen Markierstift (Polysciences, Warrington, USA) als Flüssigkeitsbarriere umrandet, um im Folgenden nicht die gesamte Oberfläche des Objektträgers in die einzelnen Behandlungs- und Waschschriffe mit einbeziehen zu müssen. Danach erfolgte der erste Waschschriff mit 0,05 molarem Triphosphatpuffer (TBS), indem 4mal alle 5 Minuten ein Tropfen mit einer Pasteur Pipette (VWR, Langenfeld) aufgetropft und anschließend wieder abgesaugt wurde.

TBS (pH7,6) Waschpuffer

6,057g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
8,766g	NaCl [=150 mmol]
40ml	1N HCl (pH-Wert auf 7,6 einstellen)
1000ml	A. dest – (ad 1L ddH ₂ O)

Da für die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit die beschriebenen Enzym-Markierungen zum Antigennachweis Verwendung fanden, mussten evtl. im Präparat vorhandene endogene Enzyme (endogene Peroxidasen) bedacht werden, da diese zur Gesamtumsetzung des Substrats beitragen und dadurch falsch positive Ergebnisse erzeugen (Luttmann et al.

2003). Hierzu wurden die Schnitte für 20 Minuten mit einer Methanol/H₂O₂-Lösung behandelt.

Hemmung der endogenen Peroxidase:

20ml Methanol
4,5ml A.dest
500µl H₂O₂ (30%)

Danach folgte wieder eine viermalige Waschung in TBS für jeweils 5 Minuten. Die Perforation der Zell- und Kernmembranen sollte die „Paratop-Epitop-Findung“ ermöglichen oder vereinfachen. Hierzu folgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit einer Ammoniumchlorid/TritonX-Lösung für 10 Minuten.

„Aufschließen“ der Zellen:

(0,5 M Ammoniumchlorid+ 0,25% TritonX/TBS)
0,59g Ammoniumchlorid
50µl Triton X
20ml TB

Im Anschluss folgten erneut vier Waschschritte in TBS und die Blockierung potentieller unspezifischer Antikörperbindestellen mit einer Block-Lösung für eine Stunde (5% BSA (Rinderalbumin) in TBS) (BSA, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Nach dieser einstündigen Blockierung unspezifischer Bindungsstellen war die Vorbehandlung der Präparate abgeschlossen und es konnte mit der eigentlichen Immundetektion begonnen werden.

Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen:

(5% Bovine Serum Albumin)
20ml TBS
1g BSA

Als letzter Schritt des ersten Tages kam es zur Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper (Monoclonal Mouse Anti- Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC 10, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Dieser wurde mit einer Konzentration von 1:100 bei PCNA in 0,8%igem BSA aufgetropft und über Nacht einwirken lassen. Als Negativkontrolle wurde die rechte Seite wie in nur mit 0,8%igem BSA behandelt. Dadurch wurde getestet ob die Färbung mit PCNA wirklich spezifisch ist. Der Sekundärantikörper darf nur an dem Primärantikörper haften und somit eine Färbung nur auf der behandelten (in diesem Falle rechten) Seite des Objektträgers sichtbar sein. Die Objektträger wurden über Nacht in den geschlossenen feuchten Kammern im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Dies entsprach in etwa einem Zeitraum von 12 Stunden. Am nächsten Tag erfolgten zunächst vier Waschschriffe in TBS und die Inkubation mit dem spezies-spezifischen biotinylierten Antikörper (Polyclonal Goat Anti Mouse Immunoglobolins Biotinylated) auf beiden Seiten des Objektträgers. Der Sekundär-Antikörper wurde in einer TBS-Lösung von 1:400 aufgetragen und wirkte über 60 Minuten ein. Nach den folgenden vier Waschschriffen mit TBS wurden die Schnitte mit dem Horseradish-Peroxidase-Komplex (HRP, Amersham, GE Healthcare UK LIMITED, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) in einer Konzentration von 1:150 behandelt. Die Lösung wurde ebenfalls für eine Stunde aufgetragen. Nach diesem Schritt war das für die Immundetektion notwendige Konstrukt von Antikörpern und gekoppelten Enzymlabeln vollständig. Nach weiteren vier Waschschriffen in TBS konnte mit Hilfe des DAB-Substrates die Entwicklung vorgenommen werden. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wurde eine Lösung mit 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) in Phosphatpuffer (PB) verwendet. Diese brauchte ca. 25 Minuten um eine bräunliche Verfärbung des Gewebes hervorzurufen.

1 M Phosphatpuffer (PB) (pH7,4)

14,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

2,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

mit A. dest auf 1000 ml auffüllen.

DAB-Lösung:

- [15ml 0,1M PB (pH7,4)]
- 150µl DAB-Lösung (=7,5 mg)
- 150µl NH₄Cl (=6,0 mg)
- 300µl NiSO₄(=0,05 M)
- 300µl 10%ige Glucose
- 50µl Glucoseoxidase

Der Färbevorgang wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und beim Erreichen einer ausreichenden Farbintensität, nach ca. 25 Minuten, durch Abklopfen der Substratlösung und Waschung in TBS abgestoppt. Schließlich wurde das Präparat mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und mit dem Eindeckmedium Entellan (Merck, Darmstadt) unter einem Deckgläschen auf dem Objektträger fixiert.

Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung:

- 2 min. spülen in 70% Ethanol
- 2 min. spülen in 96% Ethanol
- 2 min. spülen in 100% Ethanol
- 2 min. Xylol

2.7 Statistik

Für die Graphiken der Versuchsergebnisse wurde das Programm Excel 2003 (Microsoft[®], Toulouse, France) eingesetzt. Alle Werte werden im arithmetischen Mittelwert \pm der Standardabweichung angegeben.

Die Auswertung der Querschnittzunahmen der Muskelfasern erfolgte mittels einem unabhängigen T-Test, die Veränderungen der Muskelfasertypisierung

wurden durch einen Wilcoxon-Test auf Signifikanzen geprüft. Beide Test wurden mit dem Programm SPSS 12,0 (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt.

Die statistische Signifikanz wurde durch die folgenden Symbole festgesetzt:

- P < 0.05 *signifikant
- P < 0.01 **hochsignifikant
- P < 0.001 ***sehr hochsignifikant

3 Ergebnisse

3.1 Kraftwerte

Die Krafttests wurden an der Leg-Extension Maschine der Firma Gym 80 (Gelsenkirchen, Deutschland) durchgeführt. Der jeweils beste Wert aus drei Versuchen eines jeden Probanden ging in die Berechnung des Mittelwertes der entsprechenden Gruppe ein. Dargestellt sind im Folgenden die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der maximal erzielten Werte der statischen Kraftmessungen.

3.1.1 Absolute und relative statische Kraft

Zu erkennen war eine signifikante Steigerung ($p < 0,05$) der absoluten statischen Kraft der Kraftgruppe (Tab. 2). Hier verbesserten sich die Werte von $2400,3 \pm 264,9$ N auf $2749,5 \pm 405,6$ N. Dies entspricht einer prozentualen Veränderung von 14,5%. Keine signifikante Verbesserung war in der Ausdauergruppe und in der Kontrollgruppe zu erkennen. In der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter ($p = 0,33$) Rückgang der Mittelwerte ($2545,5 \pm 357,6$ auf $2395,5 \pm 546,2$ N) gemessen werden. Die Werte der Ausdauergruppe blieben mit $2766 \pm 607,2$ bzw. $2849 \pm 426,6$ N konstant ($p = 0,54$).

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der absoluten [N] und relativen statischen Kraft [N/kgKG] der Kraft-, Ausdauer-, und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

Gruppe	Statische Kraft absolut [N]		Statische Kraft relativ [N/kgKG]	
	Prae	Post	Prae	post
Kraft	2400,3	2749,5*	31,98	35,4*
SD	264,9	405,6	2,76	3,1
Ausdauer	2766,2	2849,0	33,34	34,6
SD	607,9	426,6	6,63	3,8
Kontrolle	2545,5	2395,5	34,14	31,9
SD	357,6	546,2	3,89	7,3

*Signifikant erhöht zum Praetest ($p \leq 0,05$).

Bezieht man die statischen Kraftwerte auf das jeweilige Körpergewicht, ausgedrückt durch die relative statische Kraft [N/kgKG], ergab sich ein ähnliches Bild (Abb.20). Die einzige signifikante Veränderung ($p \leq 0,05$) fand in der Kraftgruppe statt. Diese erzielte im Endtest den Spitzenwert von $35,4 \pm 3,1$ Newton pro Kilogramm Körpergewicht. Sowohl die Ausgangswerte ($2766,2 \pm 607,2$ N) als auch die Endwerte ($2849 \pm 426,6$ N) der Ausdauergruppe lagen über denen der Kraftgruppe.

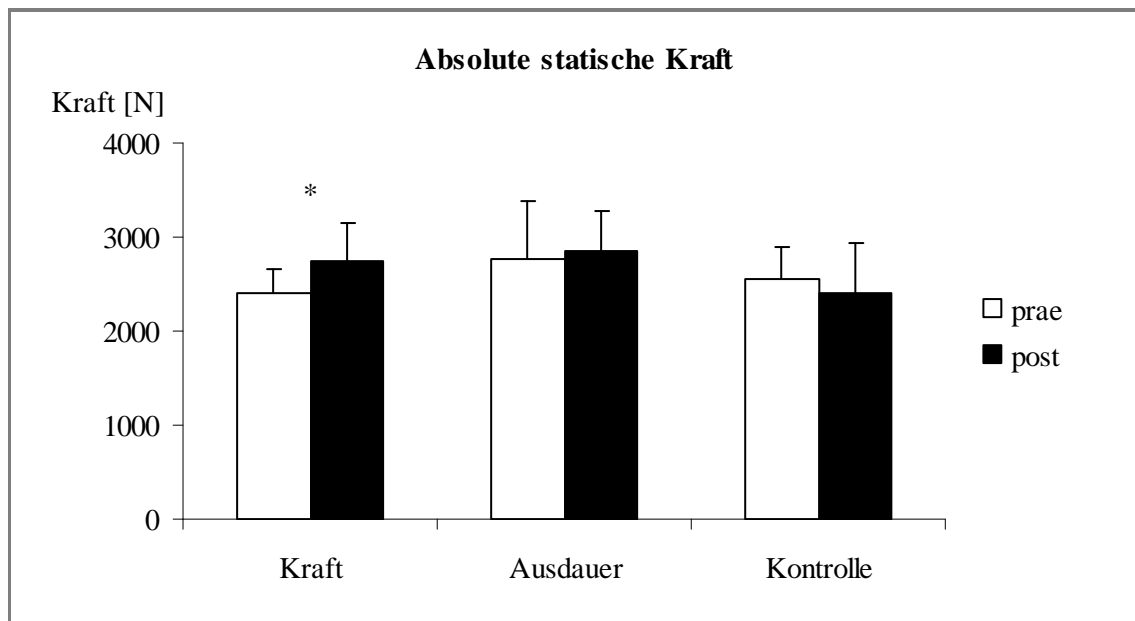


Abbildung 19: Mittelwerte und Standardfehler der absoluten statischen Kraft [N] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

*Signifikante Erhöhung der Kraft in der Kraftgruppe nach dem 12-wöchigen Training ($p \leq 0,05$).

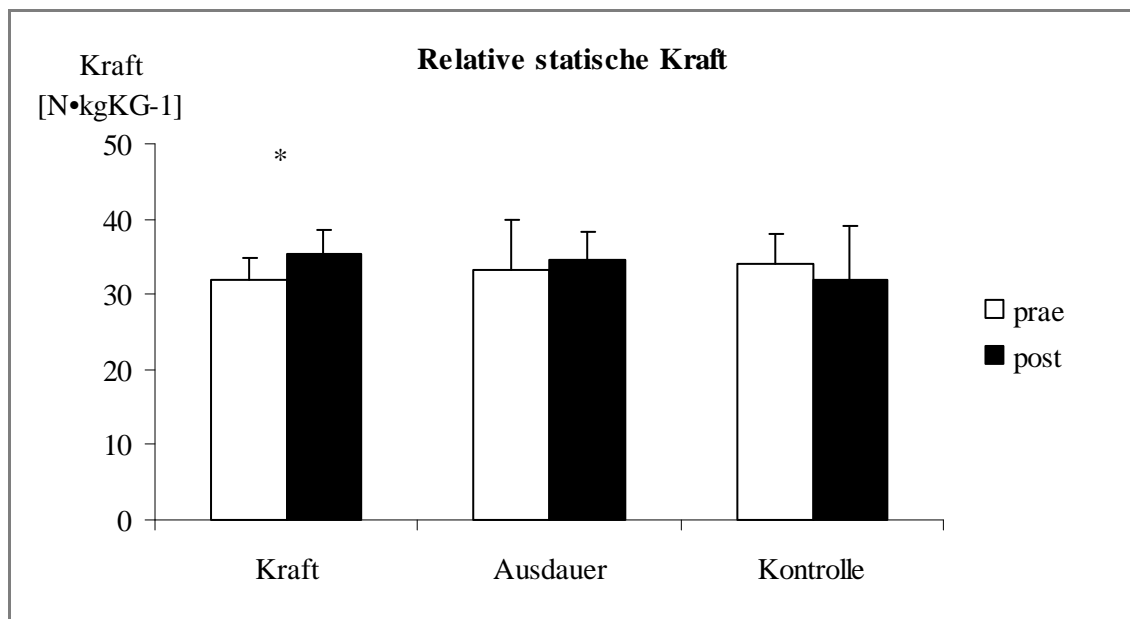


Abbildung 20: Mittelwerte und Standardfehler der relativen statischen Kraft [N] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

*Signifikante Erhöhung der Kraft in der Kraftgruppe nach dem 12-wöchigen Training ($p \leq 0,05$).

3.2 Ausdauerwerte

Die verschiedenen Parameter der Ausdauerleistung wurden während eines stufenförmigen Belastungstests erhoben. Zur Berechnung wurden die Werte der einzelnen Probanden für jede Gruppe gemittelt. Bei der maximalen relativen Sauerstoffaufnahme wurden die Werte aus der letzten komplett durchgelaufenen Stufe herangezogen, die Blutabnahme zur Ermittlung der Laktatwerte und das Ablesen der Herzfrequenz erfolgten zum Ende jeder gelaufenen Stufe.

3.2.1 Maximale Sauerstoffaufnahme

Die statistische Berechnung der maximalen Sauerstoffaufnahme ergab weder zwischen den Gruppen noch zwischen Eingangs- und Endtest signifikante Unterschiede. Die höchsten Werte wurden im Eingangstest erzielt. Die Kraftgruppe erreichte einen durchschnittlichen Wert von $53 \pm 11,6$ ml pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der maximalen relativen Sauerstoffaufnahme (VO₂max) der einzelnen Gruppen (Kraft, Ausdauer, Kontrolle) im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

Gruppe	VO ₂ max [ml/kg/min]			
	prae	SD	post	SD
Kraft	53	11,6	51,1	10,8
Ausdauer	52,5	5,9	46	8,9
Kontrolle	51,1	8,4	50,4	7,4

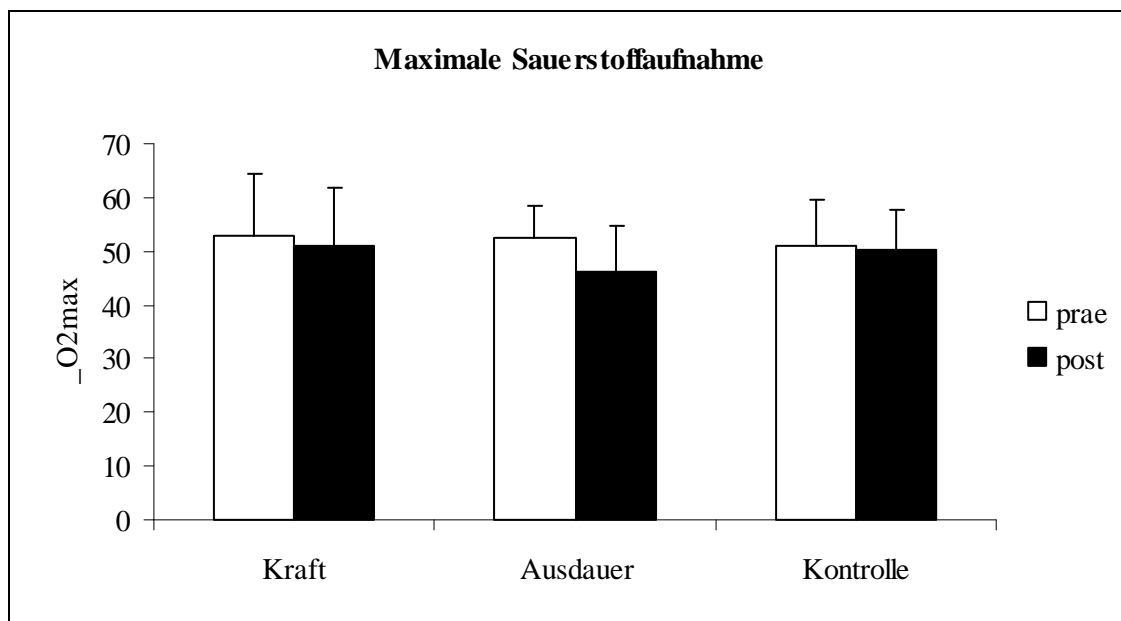


Abbildung 21: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der maximalen relativen Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) der einzelnen Gruppen (Kraft, Ausdauer, Kontrolle) im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

3.1.1 Laktatwerte

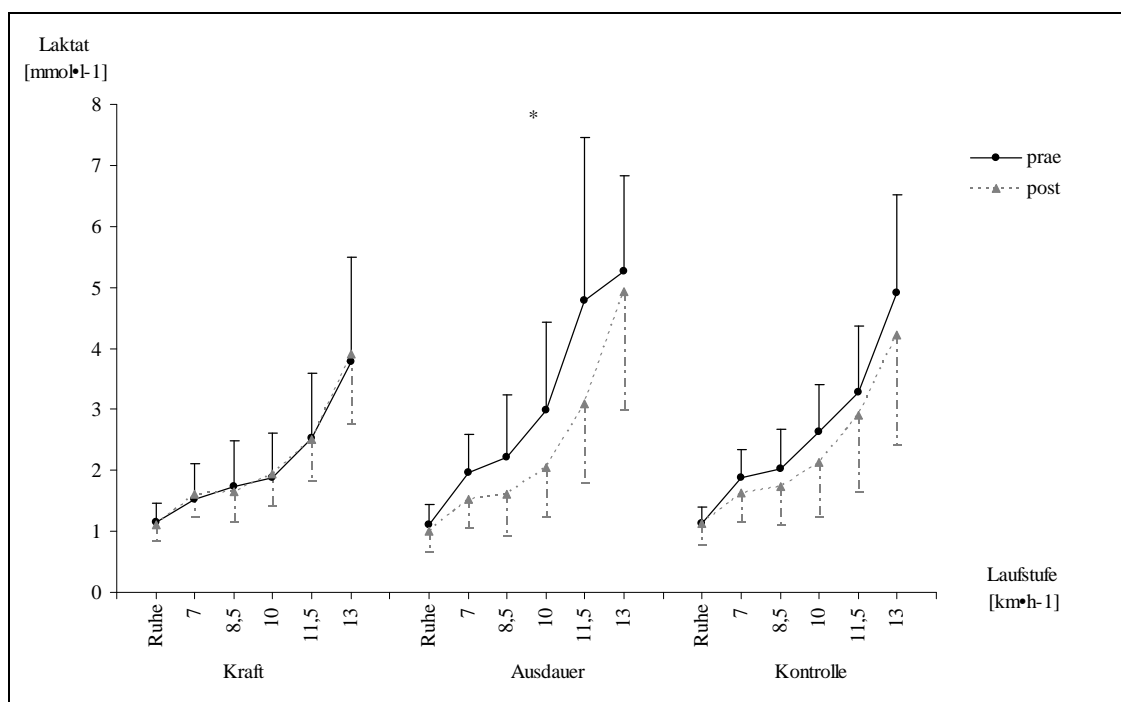


Abbildung 22: Mittelwerte und Standardfehler der Laktatwerte [mmol/l] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

* Signifikante Verminderung der Laktatwerte in der Ausdauergruppe nach dem 12-wöchigen Training ($p \leq 0,05$).

In Bezug auf die Laktatwerte ließ sich in der Ausdauergruppe eine signifikante Verbesserung ($p \leq 0,05$) verzeichnen. Die Werte waren im Endtest in jeder Stufe niedriger als im Eingangstest (siehe Abb. 22). Ein nahezu identischer Verlauf der Laktatkurven ergab sich durch kaum voneinander abweichende Werte im Eingangs- und Endtest der Kraftgruppe. In der Kontrollgruppe fand keine signifikant verminderte Laktatproduktion nach dem zwölfwöchigen Training während der Ausdauerbelastung im Endtest statt.

Die Probanden der Ausdauergruppe wiesen im Eingangstest höhere Laktatwerte auf als die der Kraftgruppe ($p > 0,05$). Der Messwert nach der ersten gelaufenen Stufe zeigte eine Laktatkonzentration von $1,53 \pm 0,58$ mmol/l in der Kraftgruppe gegenüber $1,96 \pm 0,63$ mmol/l in der Ausdauergruppe. Eine zusammenfassende Darstellung der Mittelwerte der Laktatkonzentration zu Beginn des Tests (Ruhe) und bei den Laufstufen von 7 bis 13 km/h im Eingangs- und Endtest gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Mittlere Laktatwerte [mmol/l] und Standardabweichungen (SD) der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe zu Beginn des Stufentests (Ruhe) und in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

Gruppe	Laktatwerte [mmol/l]											
	Ruhe		7 km/h		8,5 km/h		10 km/h		11,5 km/h		13 km/h	
	prae	post	prae	post	prae	post	prae	post	prae	post	prae	post
Kraft	1,2	1,1	1,5	1,6	1,7	1,65	1,9	1,95	2,5	2,5	3,8	3,9
SD	0,3	0,26	0,6	0,36	0,8	0,51	0,7	0,55	1,1	0,68	1,7	1,14
Ausdauer	1,1	1,00*	2	1,53*	2,2	1,61*	3	2,04*	4,8	3,09*	5,3	4,93*
SD	0,3	0,36	0,6	0,48	1	0,68	1,4	0,8	2,7	1,31	1,6	1,95
Kontrolle	1,1	1,12	1,9	1,64	2	1,73	2,6	2,12	3,3	2,91	4,9	4,21
SD	0,3	0,35	0,5	0,49	0,6	0,64	0,8	0,88	1,1	1,28	1,6	1,81

* Summe der Laktatwerte der Ausdauergruppe im Endtest (post) signifikant niedriger als im Eingangstest (prae).

Die gelaufenen Geschwindigkeiten an den zwei und vier mmol/l Laktatschwellen sind in Tabelle 5 dargestellt. Es waren keine signifikanten Veränderungen zu erkennen. Die größten Veränderungen traten in der Ausdauergruppe bezüglich der Geschwindigkeit zwischen Eingangs- und Endtest an der vier mmol/l Schwelle auf ($p > 0,05$); während im Eingangstest diese Schwelle bei $11,54 \pm 1,49$ km/h erreicht wurde, liefen die Probanden im Endtest eine Geschwindigkeit von $12,44 \pm 1,28$ km/h.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Geschwindigkeiten [km/h] an den 2 und 4 mmol/l Laktatschwellen der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

Geschwindigkeiten [km/h] an den 2 und 4mmol/l Schwellen				
Gruppe	2mmol/l		4mmol/l	
	prae	post	prae	post
Kraft	10,39	10,6	13,14	13,05
SD	2,09	0,91	1,2	0,8
Ausdauer	9,73	10,3	11,54	12,44
SD	1,31	1,47	1,49	1,28
Kontrolle	9,66	10,34	12,26	12,93
SD	1,58	1,14	1,22	1,01

3.2.2 Herzfrequenz

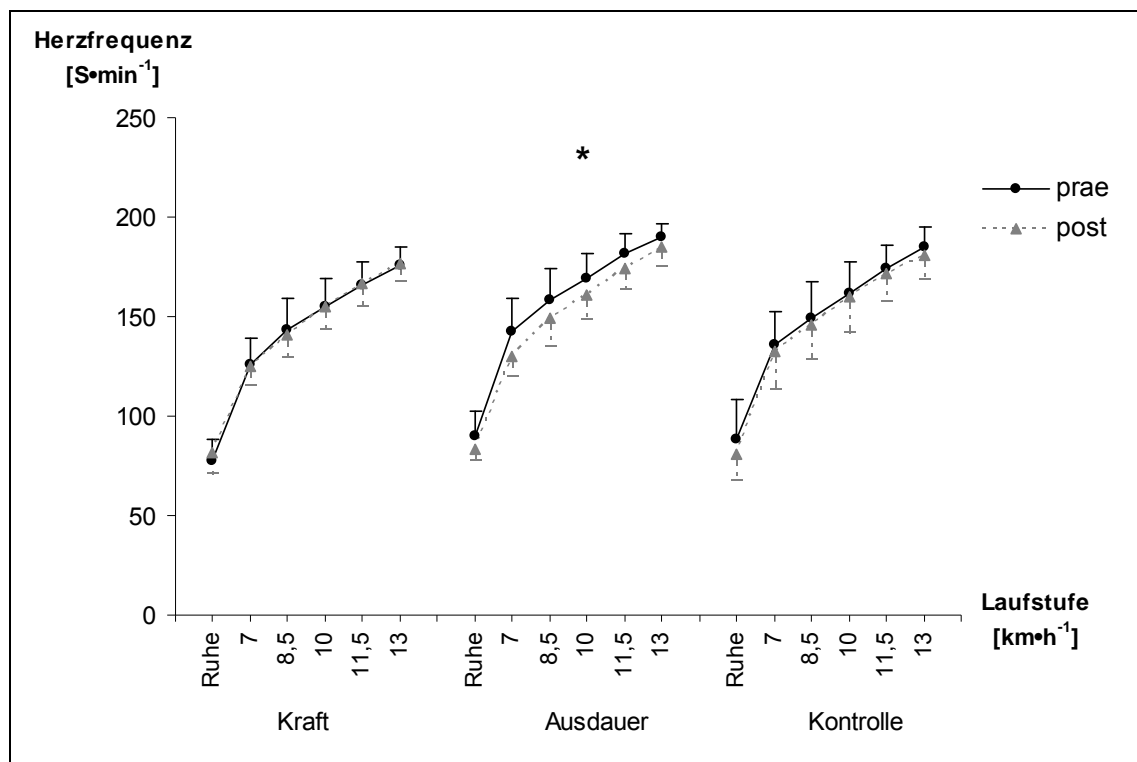


Abbildung 23: Mittelwerte und Standardfehler der Herzfrequenzen [S/min] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

*Signifikante Verminderung der Herzfrequenzen in der Ausdauergruppe nach dem 12-wöchigen Training ($p \leq 0,05$).

Eine signifikante Änderung ($p \leq 0,05$) der Herzfrequenz zeigte lediglich die Ausdauergruppe. In dieser Gruppe sank die Schlagfrequenz um durchschnittlich $8,04 \pm 2,21$ Schläge pro Minute. In der Kraft- sowie auch Kontrollgruppe blieben die Werte zwischen Eingangs- und Endtest unverändert; es zeigte sich ein nahezu identischer Kurvenverlauf (Abb. 23).

Wie auch bei der Laktatkonzentration lagen die Werte der Ausdauergruppe im Eingangstest über denen der Kraft- und Kontrollgruppe (n.s.) und trotz einer signifikanten Reduktion der Schlagzahl durch das zwölfwöchige Training war dies ebenso im Endtest der Fall. Eine Zusammenfassung der Mittelwerte der

Herzfrequenzen der drei Gruppen in den einzelnen Laufstufen im Eingangs- und Endtest ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Mittlere Herzfrequenzen [S/min] und Standardabweichungen (SD) der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe zu Beginn des Stufentests (Ruhe) und in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

Gruppe	Herzfrequenzen [S/min]											
	Ruhe		7 km/h		8,5 km/h		10 km/h		11,5 km/h		13 km/h	
	prae	post	prae	post	prae	post	prae	post	prae	post	prae	post
Kraft	78	82	126	125	143	141	155	155	166	166	176	177
SD	10	11	13	10	16	12	15	12	12	11	9	10
Ausdauer	90	83*	142	130*	158	149*	169	161*	181	174*	190	185*
SD	12	6	17	9	16	14	12	13	10	10	7	10
Kontrolle	88	81	136	132	150	146	162	160	174	172	185	181
SD	20	14	17	19	18	18	16	18	12	14	10	12

* Summe der Herzfrequenzen der Ausdauergruppe im Endtest (post) signifikant niedriger als im Eingangstest (prae).

In folgender Tabelle sind die Herzfrequenzen an den zwei und vier mmol/l Laktatschwellen aufgelistet. Es traten keine signifikanten Veränderungen auf ($p > 0,05$). Der größte Anstieg der Herzfrequenz war bei den Mittelwerten in der Kontrollgruppe zwischen Eingangs- und Endtest zu finden; im Eingangstest wurde die 2 mmol/l Schwelle bei einer Herzfrequenz von $149,32 \pm 9,73$ S/min erreicht, im Endtest hingegen verschob sich diese Schwelle auf eine Herzfrequenz von $162,59 \pm 12,47$ S/min.

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Herzfrequenzen an den 2 und 4 mmol/l Laktatschwellen der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).

Gruppe	Herzfrequenzen an den 2 und 4 mmol/l Schwellen			
	2mmol/l		4mmol/l	
	prae	post	prae	post
Kraft	155	158	178	177
SD	19	9	10	7
Ausdauer	157	161	182	182

SD	8	6	5	7
Kontrolle	149	163	181	181
SD	10	12	6	9

3.3 Myostatinregulation

Die Auswirkungen des Trainings auf den Myostatin mRNA Gehalt wurde mittels Real Time PCR Analyse durchgeführt. Die Werte wurden statistisch berechnet und die Regulation als „Fold Induction“ dargestellt. Die Ausgangswerte „prae“ wurden zum Vergleich gleich eins gesetzt und weisen somit keine Standardabweichung auf.

3.3.1 Myostatinwerte Kraftgruppe

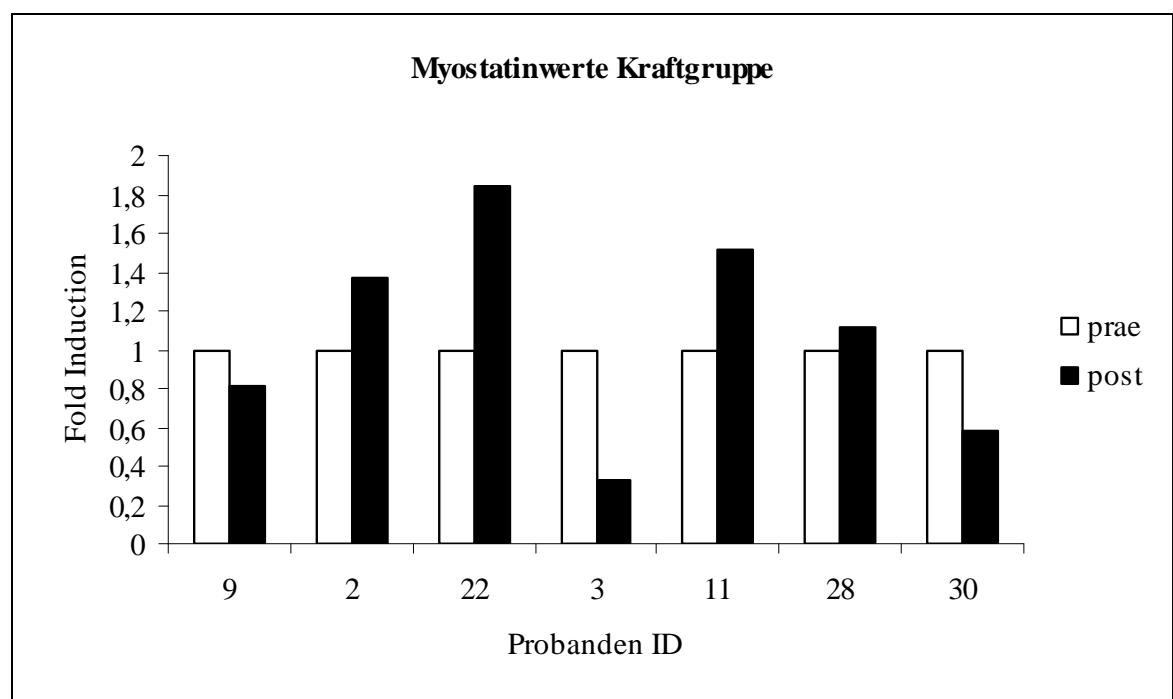


Abbildung 24: Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = (2^{-ddCT}) ; 7 Probanden der Kraftgruppe im prae/post Vergleich.

Wie in Abb. 24 zu erkennen ist, verzeichneten die Probanden 2 (1,37), 22 (1,84), 11 (1,52) und 28 (1,12) eine Zunahme der Myostatinexpression im

prae/post Vergleich und die Probanden 9 (0,81), 3 (0,33), und 30 (0,58) eine Abnahme der Myostatinexpression (FoldInduction).

3.3.2 Myostatinwerte Ausdauergruppe

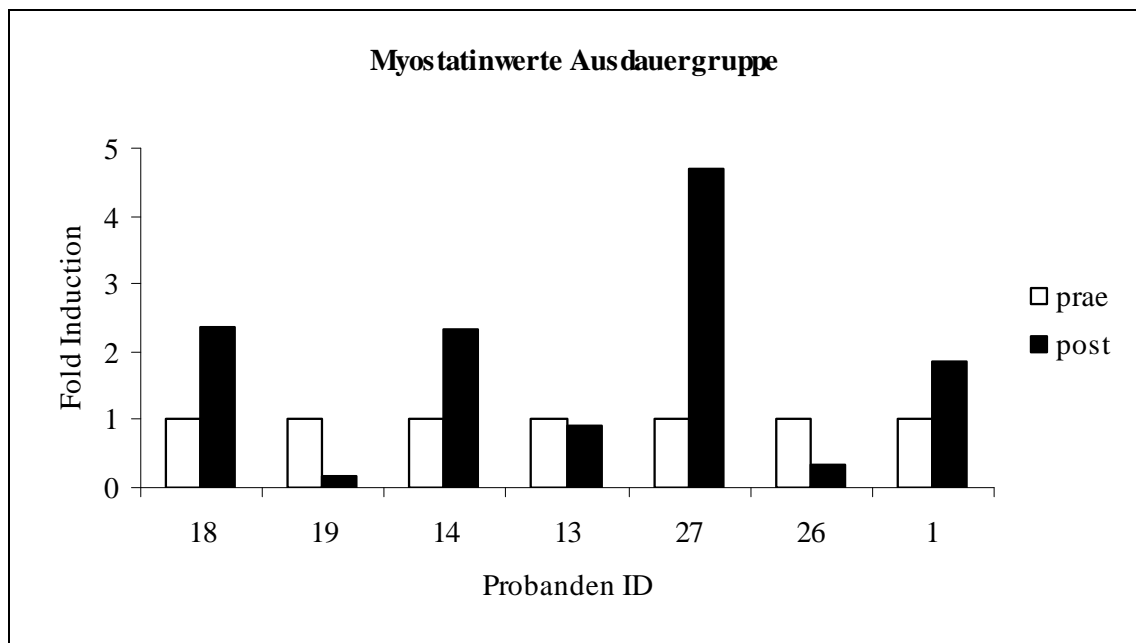


Abbildung 25: Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = (2^{-ddCT}) 7 Probanden der Ausdauergruppe im prae/post Vergleich.

Bei den Probanden der Ausdauergruppe ID Nummer 18 (2,35), 14 (2,33), 27 (4,69) und 1 (1,87) ist eine Steigerung der Myostatinexpression zu beobachten, bei den Probanden 19 (0,18), 13 (0,91), und 26 (0,34) eine verminderte Myostatinexpression.

3.3.3 Myostatinwerte Kontrollgruppe

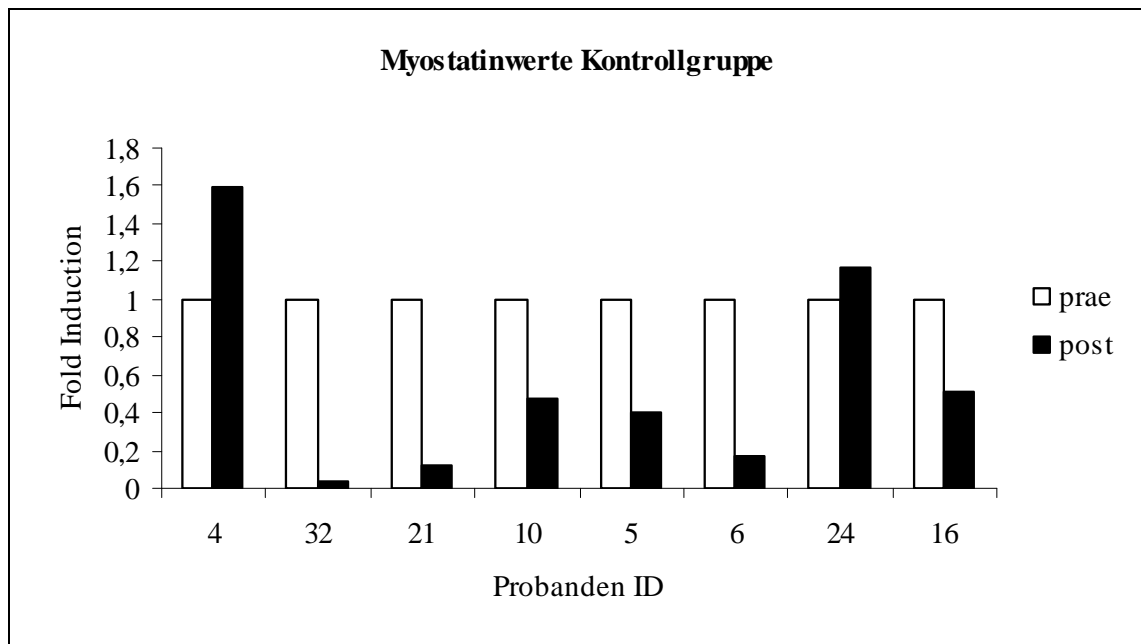


Abbildung 26: Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = $(2^{-\Delta\Delta CT})$ 8 Probanden der Kontrollgruppe im prae/post Vergleich.

Die Myostatinwerte der Kontrollgruppe zeigten eine Zunahme der Folinduction bei den Probanden 4 (1,59) und 24 (1,17) und eine Abnahme bei den Probanden 32 (0,04), 21 (0,12), 10 (0,47), 5 (0,4), 6 (0,17), 16 (0,51).

3.3.4 Myostatinwerte im Gruppenvergleich

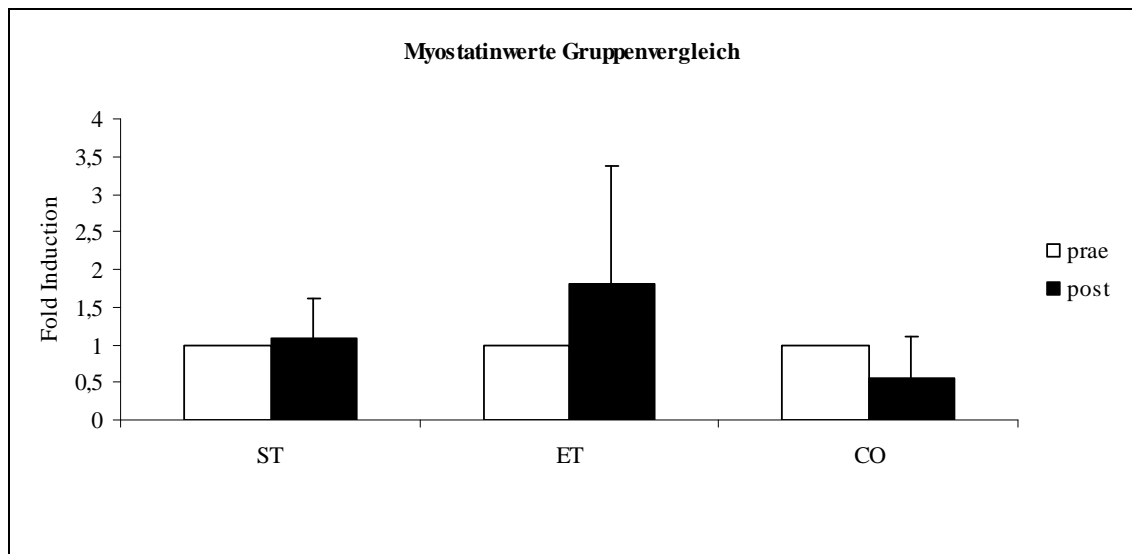


Abbildung 27: Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = (2^{-ddCT}) 8 Probanden der aller Gruppen im Vergleich (prae/post).

Im Gruppenvergleich ist zu erkennen dass die Kraftgruppe (ST) keine signifikanten Veränderungen hatte ($1,08 \pm 0,54$) ($p > 0,05$). Die Ausdauergruppe (ET) hatte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Myostatinwerte ($1,81 \pm 1,55$) ($p > 0,05$) und die Kontrollgruppe auch nicht ($0,56 \pm 0,55$).

3.4 Muskelfaserdurchmesser

Um den Faserdurchmesser zu bestimmen wurde in den einzelnen Fasern der jeweils geringste Durchmesser „skeletal myocyte diameter“ (SMD) gemessen um Abweichungen durch eine verschobene Schnittebene möglichst auszuschließen (siehe Material und Methode). Die Werte wurden in μm gemessen und die Probanden der verschiedenen Gruppen im „prae-post“ Vergleich gegenübergestellt.

3.4.1 Muskelfaserdurchmesser Kraftgruppe im Probandenvergleich

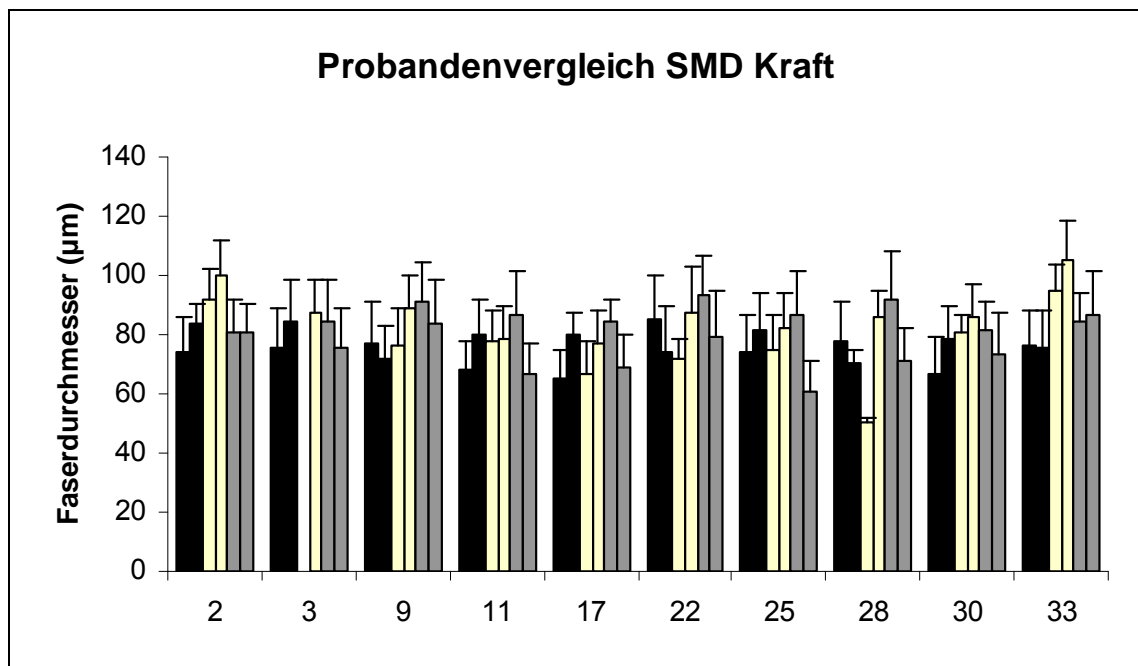


Abbildung 28: Vergleich der Probanden der Kraftgruppe bezüglich Faserdurchmesser „pre-post“. Schwarz: Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die einzelnen Probanden starke Schwankungen bezüglich des Faserdurchmessers aufwiesen. Aufgrund der abweichenden Ergebnisse der einzelnen Probanden ergibt sich für das Gesamtkollektiv nur eine geringe Zunahme des Muskelfaserquerschnitts der Typ I und IIa-Fasern, jedoch ohne signifikantes Niveau.

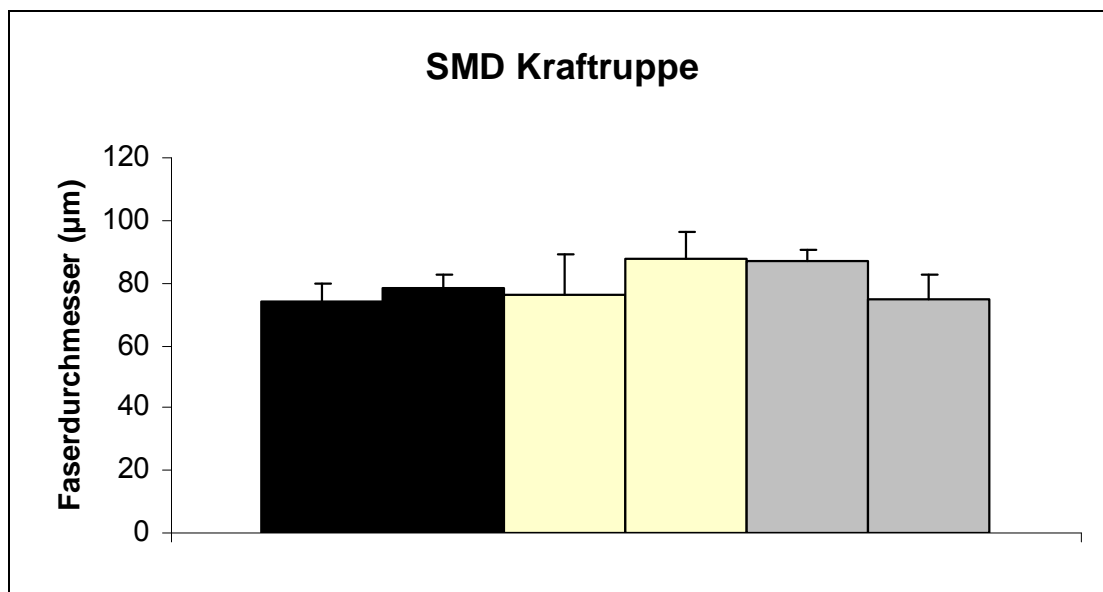


Abbildung 29: Faserdurchmesser der Kraftgruppe „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.

Die Werte steigerten sich von $73,97 \pm 5,9 \mu\text{m}$ auf $77,99 \pm 4,9 \mu\text{m}$ für Typ I und bei den Muskelfasern Typ IIa von $76,09 \pm 13,1 \mu\text{m}$ auf $87,84 \pm 8,7 \mu\text{m}$. Bei den schnellzuckenden Typ IIx Fasern ergibt sich eine geringe Abnahme von $86,62 \pm 4,3 \mu\text{m}$ auf $74,69 \pm 8,1 \mu\text{m}$. Es konnten keine Signifikanten festgestellt werden.

3.4.2 Muskelfaserdurchmesser Ausdauergruppe im Probandenvergleich

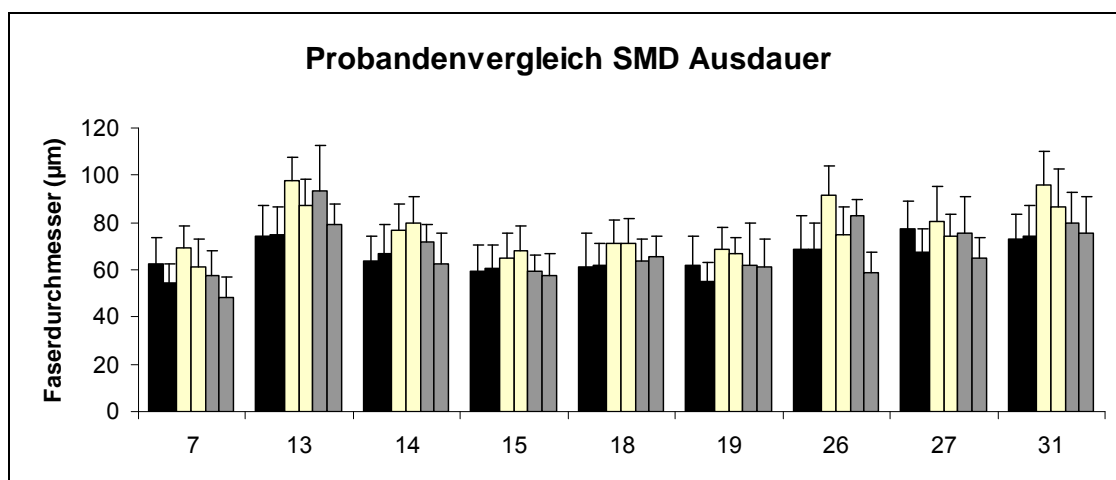


Abbildung 30: Vergleich der Probanden der Ausdauergruppe bezüglich Faserdurchmesser „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass ein starker inter-individueller Unterschied bezüglich des SMD besteht.

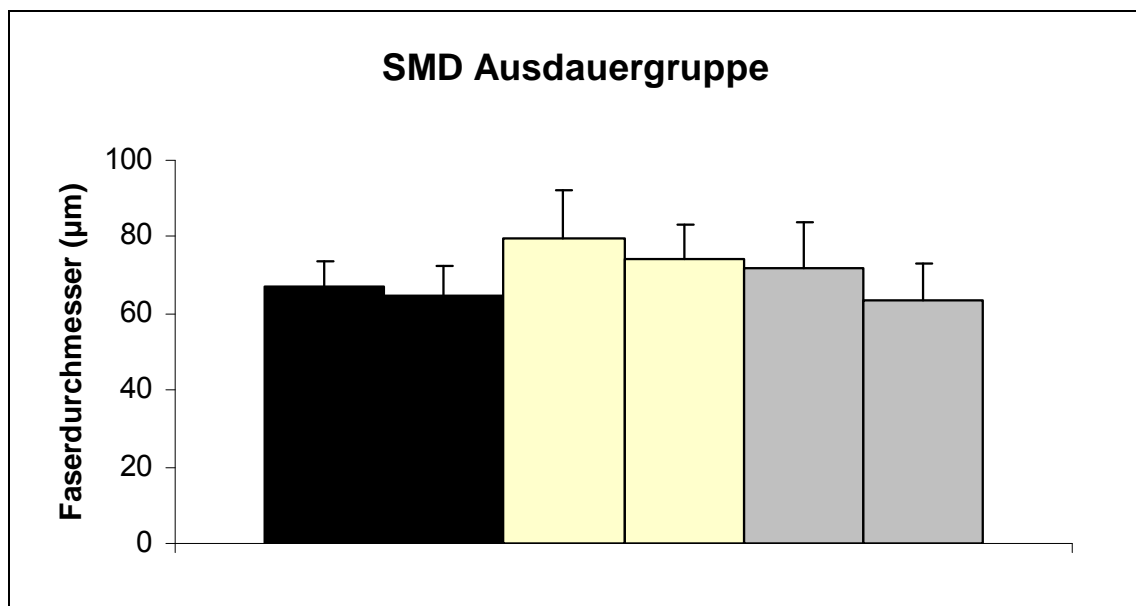


Abbildung 31: Faserdurchmesser der Ausdauergruppe „prae-post“. Schwarz: Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.

Die Werte fielen von $66,91 \pm 6,7 \mu\text{m}$ auf $64,85 \pm 7,5 \mu\text{m}$ für Typ I und bei den Muskelfasern Typ IIa von $79,60 \pm 12,7 \mu\text{m}$ auf $74,44 \pm 8,9 \mu\text{m}$. Bei den schnellzuckenden Typ IIx Fasern ergibt sich eine geringe Abnahme von $71,81 \pm 12,2 \mu\text{m}$ auf $63,74 \pm 9,2 \mu\text{m}$. Keine Signifikanzen wurden festgestellt.

3.4.3 Muskelfaserdurchmesser Kontrollgruppe im Probandenvergleich

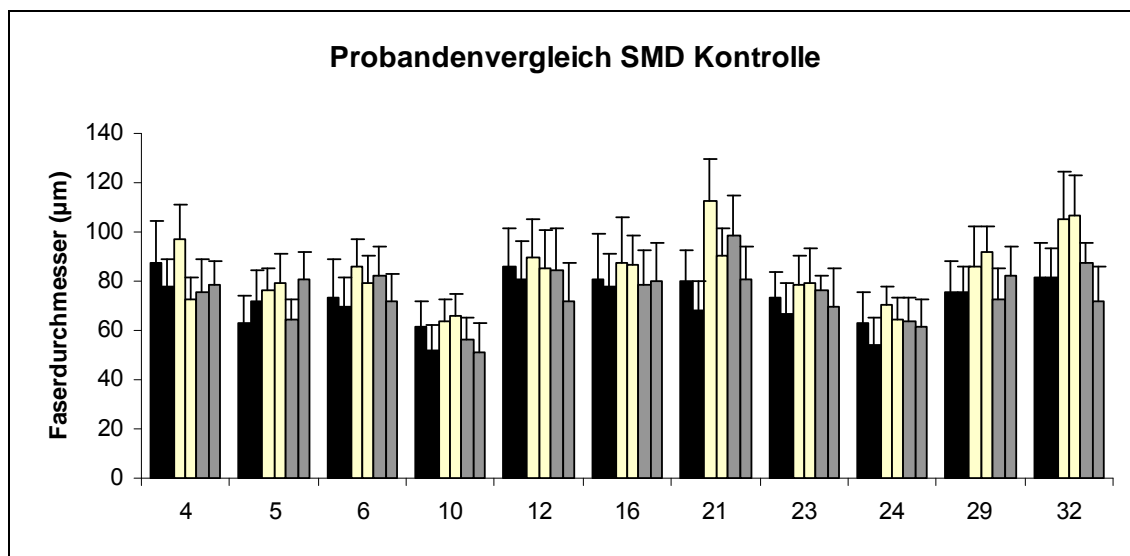


Abbildung 32: Vergleich der Probanden der Kontrollgruppe bezüglich Faserdurchmesser „prae-post“. Schwarz: Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.

In Abbildung 32 ist zu erkennen, dass ein starker inter-individueller Unterschied bezüglich des SMD besteht.

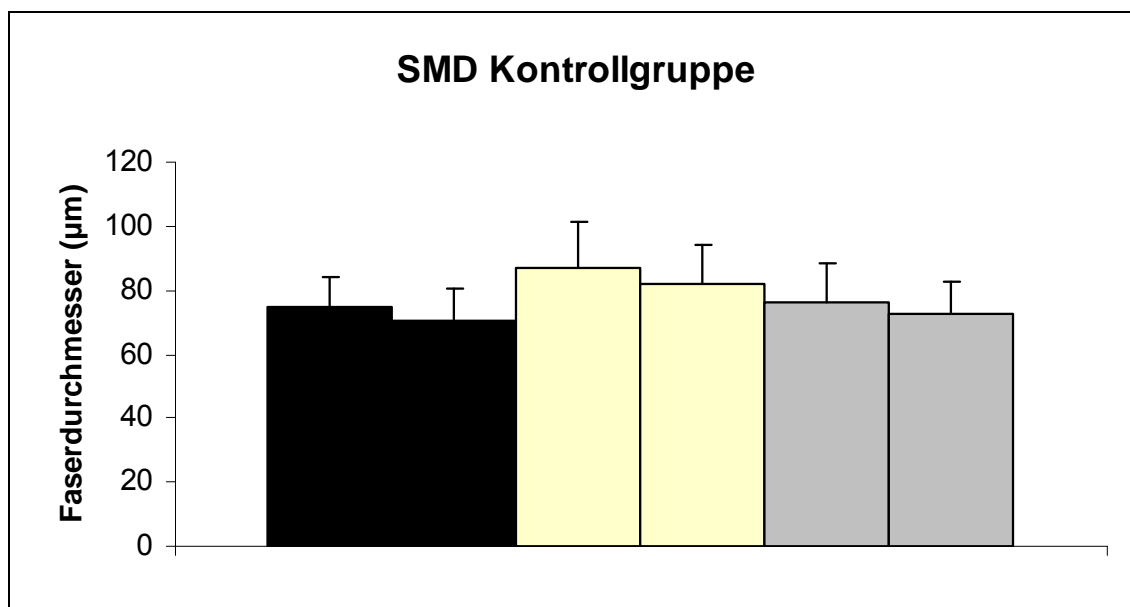


Abbildung 33: Faserdurchmesser der Ausdauergruppe „prae-post“. Schwarz: Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.

Die Werte fielen von $74,93 \pm 9,2 \mu\text{m}$ auf $70,53 \pm 10,1 \mu\text{m}$ für Typ I und bei den Muskelfasern Typ IIa von $86,71 \pm 14,5 \mu\text{m}$ auf $81,93 \pm 12,3 \mu\text{m}$. Bei den schnellzuckenden Typ IIx Fasern ergibt sich eine geringe Abnahme von $76,39 \pm 11,9 \mu\text{m}$ auf $72,81 \pm 9,6 \mu\text{m}$. Es konnten keine signifikanten Veränderungen erkannt werden.

3.5 Muskelfaserverteilung

3.5.1 Faserverteilung Kraftgruppe

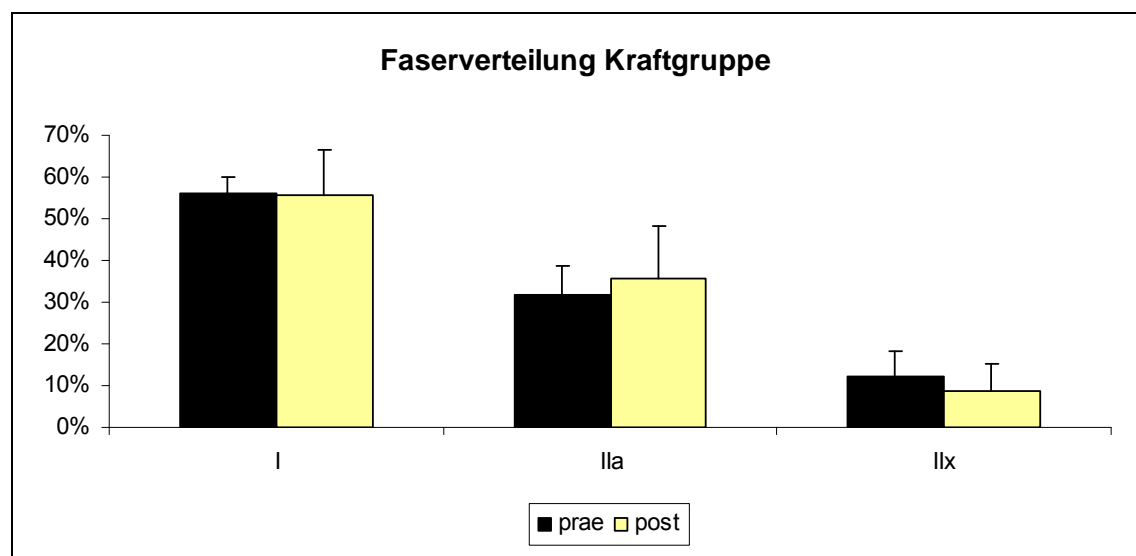


Abbildung 34: Muskelfaserverteilung in Prozent des rechten M vastus lateralis vor und nach einem 12 wöchigem Krafttraining.

In der Abbildung 34 sieht man die durchschnittliche Verteilung der Muskelfasern der Probanden der Kraftgruppe vor dem Interventionstraining, wobei 55% der vorhandenen Fasern dem Typ I (langsam) zuzuordnen sind, 33% dem Typ IIa (schnell) und 12% dem Typ IIx (sehr schnell). Nach dem Interventionstraining wurden 56% der Muskelfasern dem Typ I zugeordnet, 36% dem Typ IIa und 8% dem Typ IIx. Es ist keine signifikante Veränderung der Muskelfaserverteilung zu erkennen.

3.5.2 Faserverteilung Ausdauergruppe

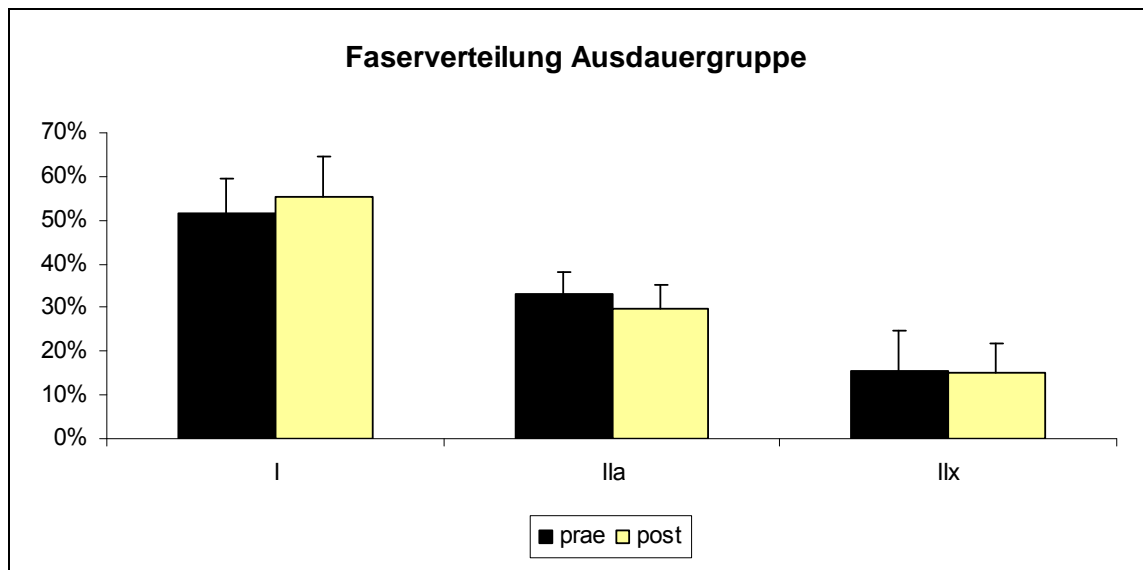


Abbildung 35: Muskelfaserverteilung in Prozent des rechten M vastus lateralis vor und nach einem 12 wöchigem Ausdauertraining.

In Abb. 35 sieht man die durchschnittliche Faserverteilung der Probandengruppe der Ausdauergruppe vor der Interventionsstudie, wobei 51% der Fasern dem Typ I zuzuordnen sind, 33% dem Typ IIa und 16% dem Typ IIx. Nach der Interventionsstudie wurden 55% dem Typ I zugeordnet, 30% dem Typ IIa und 15% dem Typ 2x. Es konnte hier keine signifikante Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung beobachtet werden.

3.5.3 Faserverteilung Kontrollgruppe

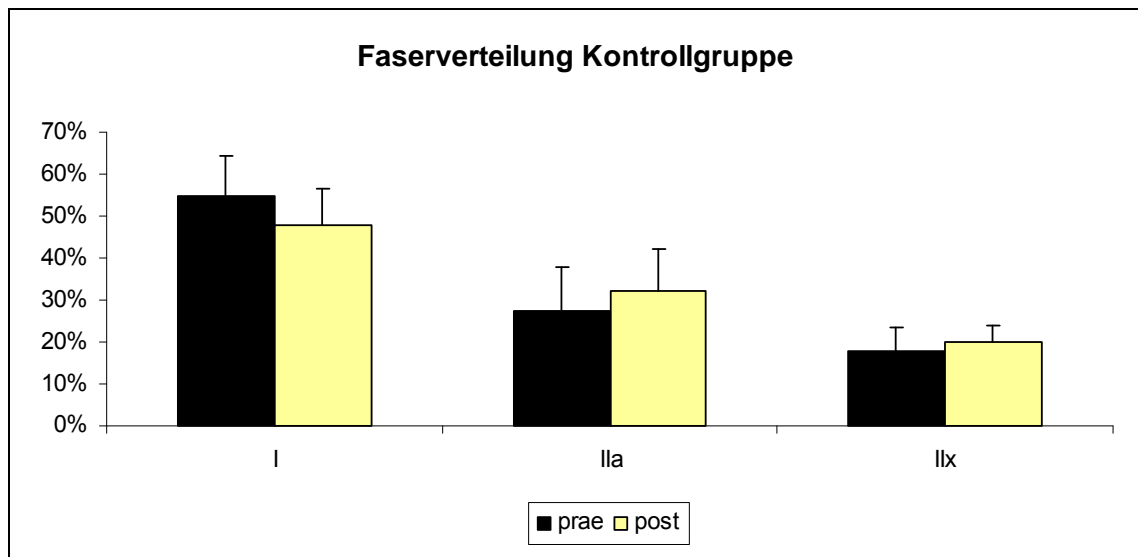


Abbildung 36: Muskelfaserverteilung in Prozent des rechten M vastus lateralis vor und nach der Studie.

In Abb. 36 sieht man die durchschnittliche Faserverteilung der Probandengruppe der Kontrollgruppe vor der Interventionsstudie, wobei 55% der Fasern dem Typ I zuzuordnen sind, 27% dem Typ IIa und 18% dem Typ IIx. Nach der Studie wurden 48% dem Typ I zugeordnet, 32% dem Typ IIa und 20% dem Typ 2x. Es konnte hier keine signifikante Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung beobachtet werden.

3.6 Quantifizierung von proliferativen Satellitenzellen

Die immunhistochemische Bearbeitung der Muskelschnitte sowie die Auswertung der proliferierenden Satellitenzellen übernahm ein Diplomand unserer Arbeitsgruppe (Lars Manegold). Ein Vergleich der Proben vor und nach der Studie konnte nicht durchgeführt werden, da alle „prae-Proben“ die in Paraffin eingebettet wurden, aus nicht erkenntlichen Gründen beim schneiden im Mikrotom zerfielen. Aus diesem Grund konnten lediglich die „post-Proben“ miteinander verglichen werden. Hier werden im Folgenden die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst:

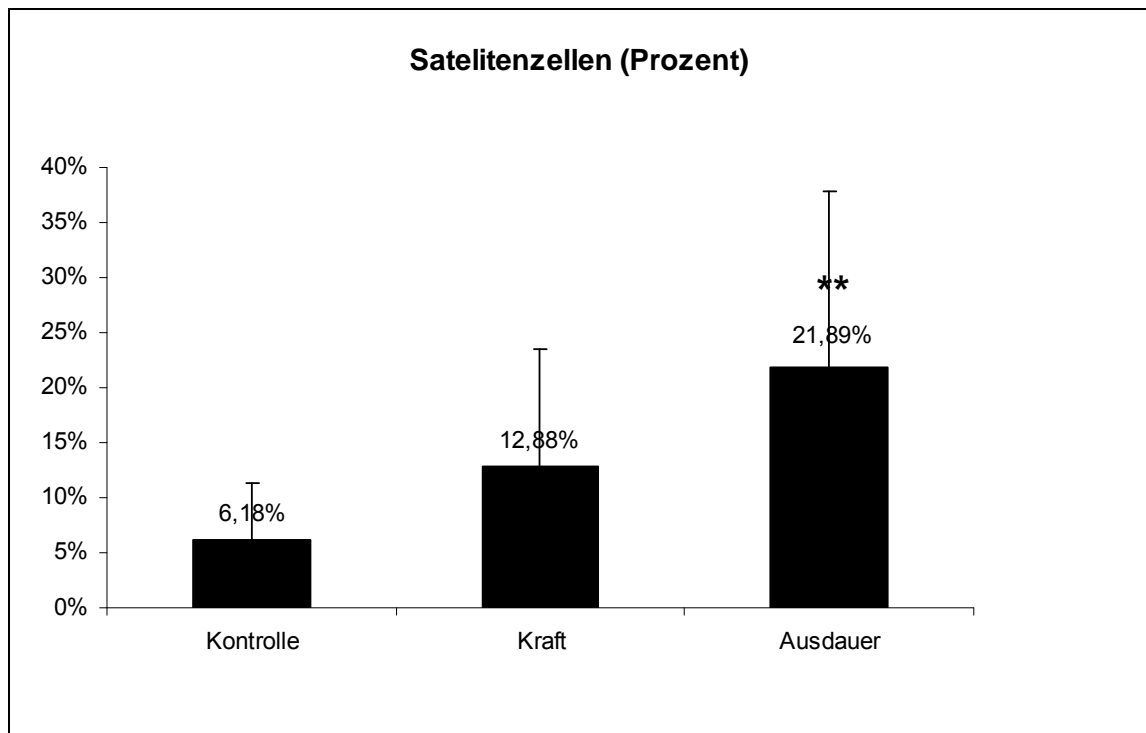


Abbildung 37: zeigt die prozentualen Anteile noch gefärbter Zellkerne bei den PCNA-Färbungen gegenüber den HE-Färbungen. Mittelwert und Standardabweichung der Prozentangaben der Kontroll-, Kraft und Ausdauergruppe.

** Hochsignifikante Erhöhung zwischen der Kontroll- u. Ausdauergruppe nach zwölfwöchigem Training ($p < 0.01$).

Die Satellitenzellanzahl bei der Kontrollgruppe liegt im Mittelwert bei $7,125 \pm 6,63$. Dies entspricht in Prozent zu den HE-gefärbten Zellkernen $6,18\% \pm 5,17\%$. Die Kraftgruppe weist einen Mittelwert von $13,75 \pm 11,62$ auf. In Prozent zu den HE-gefärbten Zellkernen entspricht dies $12,88\% \pm 10,54\%$. Trotz der tendenziellen Erhöhung konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Die Ausdauergruppe weist mit $17,92 \pm 13,12$ einen **hochsignifikant ($p < 0.01$) höheren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In Prozent entspricht dies $21,89\% \pm 16\%$.

4 Diskussion

4.1 Kraft- und Ausdauerwerte

Die Kraftwerte der Kraftgruppe haben sich signifikant verbessert. Die Ausdauerwerte der Ausdauergruppe verbesserten sich ebenfalls signifikant. Umgekehrt gab es keine Veränderungen der Kraftwerte bei der Ausdauergruppe sowie keine Veränderungen der Ausdauerwerte bei der Kraftgruppe. Die Ausdauerwerte wurden anhand der Aerob-anaeroben Laktatschwelle bestimmt. Die Aerob-anaerobe Schwelle nach Mader (1976) liegt bei vier mmol/l Laktat. Die unveränderten Laktat- und Herzfrequenzwerte der Probanden aus der Kraftgruppe in den einzelnen Laufstufen sowie bei den zwei und vier mmol/l Schwellen deuten darauf hin, dass keine Verschiebungen der aerob-anaeroben Schwelle, beziehungsweise der Laktat- und Herzfrequenzkurven stattfanden. Verantwortlich für das Ausbleiben einer verzögerten und verminderten Laktatproduktion ist wahrscheinlich die fehlende metabolische Adaptation durch Krafttraining. Es kommt zu keinen signifikanten positiven Auswirkungen auf die Mitochondriendichte, maximale Sauerstoffaufnahme, Kapillardichte, Substratspeicher und aeroben Enzymaktivitäten. Ähnliche Ergebnisse wie die in dieser Studie erzielten Ergebnisse bieten die Studien von Hickson et al. (1988), Bishop et al. (1999), Hoff et al. (1999) und Paavolainen et al. (1999). Allerdings scheint die Art bzw. die Anwendungsform des Krafttrainings entscheidend für eine Adaptation der Ausdauer verantwortlich zu sein. So führten Marcinik et al. (1991) an 18 untrainierten Männern im Alter von 25 bis 34 Jahren ein zwölfwöchiges Krafttraining durch. Das Training erfolgte dreimal wöchentlich, mit drei Sätzen mit 15 bis 20 Wiederholungen. Die Pausendauer lag bei 30 Sekunden. Nach der zwölfwöchigen Trainingsperiode wiesen die Probanden eine um 12% erhöhte Laktatschwelle auf, d.h. sie konnten bei einer 12% höheren Intensität (%VO₂max) fahren, bevor sie die aerob-anaerobe Schwelle erreichten. Hinzu kam, dass die Blutlaktatwerte in submaximalen Intensitäten nach der

Trainingsphase niedriger waren. Zu beachten sind hierbei die Trainingsart und die Probanden. Die kurzen Pausen und die relativ hohe Wiederholungszahl (15-20) könnten ein ausreichender Stimulus sein, um bei Untrainierten eine Verbesserung der Laktatwerte zu erzielen (Jung et al., 2003). Marcinik et al. (1991) führten die positiven Auswirkungen des Krafttrainings auf das Laktatverhalten auf die durch das Krafttraining verursachte Steigerung der Beinkraft zurück. Sie postulierten, dass die einzelnen Fasern mehr Kraft aufbringen konnten und bei gleicher Belastung weniger Leistung aufbringen mussten. Die Einsparung anaerober Energiegewinnung würde folglich zu einer geringeren Laktatproduktion führen. In den meisten Krafttrainingsstudien, die mit submaximalen Lasten (ca. 80% der Maximalkraft) und Pausenzeiten zwischen zwei und vier Minuten durchgeführt wurden, konnten allerdings keine veränderten Laktatwerte nachgewiesen werden (Hickson et al. 1988, Bishop et al. 1999, Hoff et al. 1999 und Paavolainen et al. 1999). Diese Studienergebnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit. Bei der Ausdauergruppe konnten keine signifikanten Verbesserungen der Maximalkraft festgestellt werden, obwohl zahlreiche Studien einen durch Ausdauertraining resultierenden Kraftzuwachs nachweisen konnten (Bell et al. 2000, Glowacki et al. 2004, Izquierdo et al. 2005). Die Kraftzuwächse wurden allerdings nicht mit einer Hypertrophie in Verbindung gebracht und daher ist es wahrscheinlich, dass die gemessenen Kraftzuwächse auf neuronaler Ebene stattgefunden haben. Die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Studie zu den genannten Studien könnten auf das Alter und den Trainingszustand der Probanden zurückzuführen sein. Die Probanden der beiden Studien von Izquierdo et al. konnten im Gegensatz zu den Probanden vorliegender Studie ihre Kraftwerte steigern. Ein dreimal wöchentliches Ausdauertraining könnte für jüngere Probanden mit einem aktiven Trainingszustand (gekennzeichnet durch normale physische Aktivität, aber nicht speziell kraft- oder ausdauertrainiert) ein zu geringer Stimulus sein, um ähnliche Adaptationen wie bei älteren, untrainierten Probanden hervorzurufen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass bei der Krafttestung eine isolierte Beinstreckung gemessen wurde. Beim laufen

allerdings wird die gesamte Hüft- und Beinstreckmuskulatur benötigt und trainiert. In Übereinstimmung mit den Studien von Bell et al. (2000) und Glowacki et al. (2004) waren beim Beinstrecker in der Abschlusstestung keine Steigerungen der Kraftwerte zu verzeichnen. Um eine Kraftsteigerung dennoch auszuschließen, böte es sich an, bei nachfolgenden Studien nicht nur isoliert am Beinstrecker sondern auch mehrgelenkig zum Beispiel an der Beinpresse die Krafttestungen durchzuführen.

4.2 Myostatinwerte

In allen drei Gruppen konnten keine signifikanten Veränderungen der Myostatinwerte in der mRNA festgestellt werden. Im Vergleich zu anderen Studien ist das ein unerwartetes Ergebnis. So beschreiben zum Beispiel Kim et al. (2007), die mit 66 untrainierten Männern und Frauen verschiedenen Alters ein sechzehnwöchiges Krafttraining absolvierten eine deutliche Abnahme der Myostatinwerte in der mRNA im Schnitt um 52%. Das Krafttraining wurde dreimal wöchentlich mit einer Intensität von ca. 80% der Maximalkraft und je drei Sätzen pro Übung durchgeführt. Der Fokus des Trainings lag auf den Beinen (Beinpresse und Beinstrecker), da die Biopsien ebenfalls an den Oberschenkelmuskeln genommen wurden. Sowohl das Alter der Probanden als auch das Geschlecht hatten keinen besonderen Einfluss auf die verringerte Myostatinexpression im Muskel. Die Autoren unterschieden außerdem noch nach „responder“ und „non-responder“ und konnten auch hier keine statistischen Unterschiede feststellen. Die Myostatin- Propeptide veränderten sich durch das Training nicht. Allerdings wurde ein Anstieg von 44% des Myostatin- Proteins gemessen und die Autoren erklären damit den gesunkenen Myostatin mRNA Wert gemäß der so genannten „Myostatin-Auto-Regulation“ nach Forbes et al. (2006). Diese Theorie besagt, dass hohe Myostatin- Protein-Werte durch ein negatives Feedback von Smad7 abhängigen Mechanismen zu verminderten Myostatin mRNA Werten führen können. Ein ähnliches Ergebnis konnten Roth et al. (2003) bei einem neunwöchigen rein konzentrischen

Krafttraining an hydraulischen Geräten nachweisen. Drei mal pro Woche absolvierten 15 junge und alte Männer und Frauen ein einbeiniges Krafttraining am Beinstrecker und senkten ihre Myostatinwerte im Schnitt um 37% im Vergleich zu den Werten vor der Trainingsintervention. Sowohl das Muskelvolumen als auch die Maximalkraft erhöhten sich über den Trainingszeitraum signifikant. Muskelbiopsien wurden zwei Wochen vor der Intervention und 48 – 72 Stunden nach der Intervention am trainierten Bein entnommen und mittels real time PCR wurden die mRNA Myostatinwerte gemessen. Bei vier Probanden sieht man allerdings eher einen Anstieg der Myostatinwerte. Aufgrund der geringen Probandenzahl postulieren die Autoren weitere Studien, um die Ergebnisse zu überprüfen. Kopple et al. (2006) haben mit acht Hemodialysepatienten ein neunwöchiges Ausdauertraining durchgeführt und ebenfalls einen deutlichen Rückgang der mRNA Myostatinwerte um 51% gemessen. Diese Studie lief als so genannte Pilotstudie, und in der Nachfolgestudie (Kopple et al. 2007) wurden noch mehr Hemodialysepatienten trainiert. Hier konnten die Daten von 51 Patienten ausgewertet werden, die randomisiert in eine Kraftgruppe, eine Ausdauergruppe, eine Kraft- und Ausdauergruppe und in eine Kontrollgruppe eingeteilt wurden. Die drei Trainingsgruppen trainierten jeweils dreimal pro Woche über einen Zeitraum von 18 Wochen und senkten ihre Myostatinwerte signifikant (Ausdauer: -22%, Kraft: -23%, Ausdauer-Kraft: -39%). In der Kontrollgruppe wurde hingegen ein Anstieg von 29% in der mRNA gemessen. Hittel et al. (2010) führten mit zehn insulinresistenten Männern ein sechsmonatiges Ausdauertraining (ca. 1200 kcal/Woche bei 55% VO₂max) durch und konnten ebenfalls eine Senkung des Myostatinwertes um 37% feststellen. Walker et al. (2004) führten mit 17 jungen, gesunden Männern zweimal pro Woche ein zehn- wöchiges Krafttraining durch und stellten einen durchschnittlichen Rückgang des Myostatinwertes um 20% fest. Allerdings handelte es sich hierbei um Messungen im Plasma durch so genannte „Western analysis“.

Einen kurzfristigen Rückgang der Myostatinwerte als Antwort auf einen einmaligen bzw. mehrmaligen Trainingsreiz wurde bei verschiedenen Studien festgestellt. So konnten Coffey et al. (2006) bei einem einmaligen Trainingsreiz mit 13 trainierten Sportlern unterschiedliche Ergebnisse festhalten. Die Probanden mussten entweder acht Sätze á fünf Wiederholungen mit dem jeweiligen 5er Wiederholungsmaximum oder 1 h Fahrradfahren auf dem Ergometer bei 70% der VO₂max. Die sieben krafttrainierten Probanden zeigten keinerlei signifikante Veränderung der Myostatinwerte. Bei den sechs ausdauertrainierten Sportlern konnte man nach dem Krafttraining einen signifikanten Rückgang des Myostatinwertes (0,6fach) messen und nach dem Ausdauertraining einen Anstieg (zweifach) des Myostatinwertes. Die Autoren weisen darauf hin, dass möglicherweise die sportliche Vorerfahrung der Probanden einen Einfluss auf die Regulation des Myostatinwertes haben könnte. Einen vergleichbaren Trainingsreiz setzten Louis et al. (2007) bei zwölf trainierten Probanden. Sechs Probanden mussten dreimal zehn Wiederholungen mit ca. 70% der Maximalkraft an einem Beinstrecker durchführen und sechs Probanden eine halbe Stunde bei ca. 75% der VO₂max auf einem Laufband laufen. Die Biopsien wurden unmittelbar vor und nach dem Trainingsreiz sowie 1, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden nach der Reizsetzung entnommen. Sowohl das Ausdauertraining als auch das Krafttraining lösten eine signifikante Senkung der Myostatinwerte aus, wobei das Krafttraining eine stärkere Suppression auslöste als das Ausdauertraining. Die größten Absenkungen der Myostatinwerte wurden hier nach acht Stunden (2,6-fach) bzw. nach zwölf Stunden (3,6-fach) gemessen. Diese Zeitreihenanalyse könnte darauf hinweisen, dass ca. acht bis zwölf Stunden nach der letzten Trainingseinheit die Myostatinwerte der mRNA, vermutlich als Reaktion auf den Trainingsreiz, ihre größte Suppression erfahren. Nach 24 Stunden konnte für die Laufgruppe keine signifikante Veränderung mehr gemessen werden, für die Kraftgruppe allerdings schon. Costa et al. (2007) untersuchte in ihrer Studie unter anderem die Myostatin mRNA Werte nach einem exzentrischen Krafttraining, welches an sechs aufeinander folgenden Tagen absolviert wurde.

Die neun männlichen Probanden der Trainingsgruppe mussten sechs Sätze á 15 Wiederholungen mit ihrem individuellen exzentrischen Maximalgewicht ausführen. Das exzentrische Training wurde an einem Isokineten durchgeführt. Biopsien wurden eine Woche vor dem Training, am dritten Trainingstag und 24 Stunden nach dem letzten Training entnommen. Die Myostatinwerte sanken signifikant um 74% am dritten Tag und um 72% am siebten Tag. Die Autoren erklären die extreme Suppression des Myostatin in der mRNA mit der funktionellen Wirkungsweise des Myostatin. Dieses wirkt wahrscheinlich hemmend auf die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen, welche besonders bei Verletzungen des Muskels aktiviert werden. Da ein exzentrisches Krafttraining durch die verminderte Rekrutierung von motorischen Einheiten zu Mikrotraumata der Muskulatur führen kann, hat diese Art von Krafttraining wahrscheinlich einen starken, regulativen Einfluss auf die Myostatinexpression im Muskel. Einen auxotonischen Trainingsreiz setzten Kim et al. (2005) bei insgesamt 38 jungen und alten Männern und Frauen. Nach einigen Trainingseinheiten die der Gewöhnung an die Übungen Kniebeuge, Beinpresse und Beinstrecker dienen sollten, wurden jeweils 3 Sätze mit je acht bis zwölf Wiederholungen bis zur Ermüdung durchgeführt. Die Biopsien wurden vor dem ersten Training und 24 Stunden nach dem eigentlichen Trainingsreiz entnommen. Die gesamte Gruppe verzeichnete einen Rückgang der Myostatinwerte um 44%. Die Gesamtheit wurde in vier Gruppen unterteilt. Ältere Männer und Frauen (60 – 75 Jahre) und jüngere Männer und Frauen (20 – 35 Jahre). Mit Ausnahme der älteren Frauen wurde bei allen Gruppen ein signifikanter Rückgang der Myostatinexpression gemessen. Die Autoren diskutieren, ob dieser verminderte Rückgang bei älteren Frauen mit dem in bisherigen Krafttrainingsstudien gezeigten geringeren Muskelmassezuwachs zusammenhängen könnte. Dies würde die These unterstützen, dass eine verminderte Myostatinexpression im Muskel ein indirekter Marker für ein einsetzendes Muskelwachstum sein könnte. Coffey et al. (2006) konnten nach einem einstündigen Fahrradergometer Training dagegen bei sechs ausdauertrainierten Männern einen Anstieg des

Myostatingehaltes nachweisen. Die Autoren geben keine definierte Erklärung für diesen Anstieg an, halten aber den Zeitpunkt der Biopsie, welcher unmittelbar nach dem Trainingsreiz war, für eine mögliche Erklärung. Hulmi et al. (2007) verglichen den Myostatingehalt der mRNA nach einem einzelnen Training mit dem nach einem 21-wöchigem Training. Elf ältere, untrainierte Männer mussten fünf Sätze á zehn Wiederholungen an der Beinpresse absolvieren und wurden vor dem Reiz, bzw. 1 und 24 Stunden nach dem Krafttrainingsreiz, biopsiert. Nach dem 21-wöchigen Krafttraining stellten die Untersucher einen signifikanten Anstieg (+57%) des Myostatingehaltes in der mRNA fest. Die Autoren erklären diesen Anstieg mit dem Zeitpunkt der letzten Biopsie. Unmittelbar nach dem letzten Trainingsreiz, bzw. 24 Stunden danach, wurde ein Rückgang des Myostatingehaltes gemessen. Den signifikanten Anstieg des Myostatins beobachtete man in der Biopsie vor dem letzten Trainingsreiz, und dieser fand eine Woche vom vorletzten Trainingsreiz statt. Daher beschreiben die Autoren den Anstieg als „increase of basal-resting myostatin mRNA level“. Ein wechselseitiger Zusammenhang zwischen der kurz- und langfristigen Regulation des Myostatingehaltes als Antwort auf einen Trainingsreiz wird hier angemerkt. Die Autoren errechneten statistische Korrelationen und bemerkten, dass je größer der Anstieg des Myostatingehaltes während des mehrwöchigen Krafttrainings war, desto stärker war der Abfall des Myostatingehaltes unmittelbar nach einem Krafttrainingsreiz. Der Trainingszustand der Probanden könnte demnach als weiterer Einflussfaktor für die Regulation des Myostatin mRNA Gehaltes gesehen werden. Einen langfristigen Anstieg des Myostatingehaltes konnte auch Willoughby (2004) in seiner Studie feststellen. Zwölf untrainierte, junge Männer führten ein zwölfwöchiges Krafttraining durch wobei dreimal pro Woche mit einer Intensität von 85-90% der Maximalkraft trainiert wurde. Die Biopsien wurden vor der Trainingsintervention, nach sechs Wochen und nach zwölf Wochen ca. 15 Minuten nach der letzten Trainingseinheit entnommen. Der mRNA Myostatingehalt stieg nach zwölf Wochen um 32% an. Der FLRG- Wert (Follistatin- related Gene) stieg um 127% an. Den Anstieg der FLRG- Werte

deutet Willoughby als mögliche Erklärung für den Anstieg der Myostatinwerte. Da es zu einem Muskelwachstum kam, könnten die gestiegenen FLRG- Werte ein Indiz dafür sein, dass sie durch Bindung an den Aktivin IIb Rezeptor hemmend auf das Myostatin wirkten. Der Autor diskutiert den Anstieg der Myostatinwerte im Gegensatz zum Abfall der Myostatinwerte bei Roth et al. (2003) unter anderem mit der Art des Trainings. Roth et al. ließen ihre Probanden lediglich konzentrisch trainieren und Willoughby führte mit den Probanden ein auxotonisches Training durch. Der Autor vermutet, aufgrund verschiedener Studienergebnisse, dass exzentrische Kontraktionen eine stärkere Auswirkung auf die Myostatinexpression im Muskel haben könnte. Exzentrische Kontraktionen führen im Allgemeinen zu einer stärkeren Stresssituation im Muskel und dadurch auch zu mehr Schädigungen der Muskulatur auf Mikroebene. Ob die Abweichung der Myostatinregulation im Vergleich zu den Studien von Roth et al. (2003) und Kim et al. (2007) an der angewandten Kontraktionsform beim Training oder am Zeitpunkt der Biopsieentnahme lagen, geht aus dem derzeitigen Stand der Literatur nicht hervor.

Dass der Myostatinwert in der mRNA nicht unbedingt auf eine Krafttrainingsintervention reagieren muss zeigt die Studie von Jency et al. (2010) die mit zwölf jungen Frauen sowohl exzentrische Kontraktionen als auch konzentrische Kontraktionen durchgeführt haben. Sechs Probanden führten an sieben Trainingstagen (jeweils montags, mittwochs und freitags) ein exzentrisches Beintraining durch. Sechs Probanden führten ein konzentrisches Beintraining mit je zehn Sätzen durch. Die Sätze wurden mit maximalen Lasten und einer 20-sekündigen Pause ausgeführt. Die Biopsien wurden jeweils eine Woche vor dem ersten Trainingsreiz, nach dem ersten und letzten Trainingsreiz mit jeweils acht Stunden Abstand entnommen. Die Ergebnisse zeigten weder einen signifikanten Anstieg noch einen Abfall der Myostatin mRNA Werte. Bei beiden Gruppen gab es sehr unterschiedliche Messwerte der Probanden, so dass keine Signifikanz erreicht werden konnte. Wie in der vorliegenden Studie gab es sowohl Probanden, deren Myostatinwerte gestiegen waren, als auch

Probanden, deren Myostatinwerte gesunken bzw. unverändert waren. Die Autoren führen dazu an, dass es bisher keine Studien gab, die geschlechtliche Unterschiede der Myostatinexpression nach Krafttraining in den Fokus genommen hat. Im folgenden eine Übersichtstabelle aller relevanter Myostatinstudien mit Menschen:

Autoren/ Jahr	N/ Geschlecht	Trainings- intervention	Belastungs- normative	Analyse/ Methoden	Gemessene Parameter	Myostatin- Expression
Coffey et al. (2006)	7 Krafttrainierte und 6 Ausdauertrainierte Männer	Einmaliger Trainingsreiz bei trainierten Sportlern	8x5 max. Beinstreckerübung; 1 h cycling bei 70% Vo2max	Biopsie 3h nach Belastung RT-PCR	Myostatin, MyoD, Myogenin, VEGF, PDK4, MAFBX	Nach Kraft bei ET: ↓ Nach Cycling bei ET: ↑
Costa et al. (2007)	9 gesunde untrainierte ♂, 6 Kontrolle	6 Tage hintereinander Exzentrisches Krafttraining	6x15 Wdh. MVC Exzentrisch am Dynamometer	RT-PCR,	Myostatin, MyoD, Myf5, → Myogenin ↑	Myostatin deutlich ↓ An allen Meßzeitpunkten
Gonzales- Cadavid et al. (1998)	42 gesunde Männer, 61 HIV infizierte Männer	Vergleich des Myostatingehalts von Gesunden und HIV positiven Männern.	Keine Trainingsintervention	PCR, Western Blot (Antikörper), Myostatin Immunofluoreszens	Myostatin, mRNA, Protein	Myostatin bei HIV kranken war deutlich erhöht.
Hittel et al. (2010)	10 insulinresistente Männer	Halbes Jahr Ausdauertraining	1200kcal/Woche bei 55%VO2max		Myostatin	Myostatin sank um 37%
Hulmi et al. (2007)	11 untrainierte alte Männer und 11 Kontrollpr.	Einmaliger Trainingsreiz im Vergleich zu 21 wöchigem Training	5x10 Wdh. Beinpresse über 21 Wochen	Biopsien vor, nach 1h und 24h bzw. nach 21 Wochen	Myostatin, Myogenin, Activin IIb ↓	Nach einmaligem Training: ↓ Nach 21 Wochen: ↑
Ivey et al. (2000)	11 j.♂, 11 j.♀, 12 a.♂, 11 a.♀	Unilaterales Kniestreckertraining	3x wö. HRT	MRI, Genotype	Myostatin genotype, Muskelwachstum	♂ mehr Muskelwachstum als ♀, alter kein Unterschied, 5 Frauen mit weniger Myostatin- Allelen mehr M.-

Autoren/ Jahr	N/ Geschlecht	Trainings- intervention	Belastungs- normative	Analyse/ Methoden	Gemessene Parameter	Myostatin- Expression
						wachstum
Jensky et al. (2010)	12 j. ♀	Unilaterales Kniestreckertraining, 6 konz.; 6 exz.	7 Trainingseinheiten	PCR. mRNA	Myostatin, MyoD, Follistatin	Keine Unterschiede bei Myostatin und Follistatin.
Jespersen et al. (2009)	15 untrainierte junge Männer	3 monatiges Krafttraining/ 3 monate "detraining"	4-5 Sätze a 5-16 Wdh.	Biopsien nach 30 und 90 Tagen sowie nach 3,10,30,60,90 Tagen detraining, Western blot, Antikörper	Myostatin mRNA, Protein, Faser- Histologie	Myo mRNA: nach Tr keine signifikanten Veränderungen (nurTd), nach detraining Anstieg um 79%
Kim et al. (2005)	19 Männer und 19 Frauen	Einmaliger Trainingsreiz bei alten und jungen Probanden	3x12 Wdh. Beinpresse und Beinstrecker	Biopsie 24h nach Belastung RT-PCR	Myostatin, p21cip, p27cip, Cyclin B1 und D1, MGF	Deutlicher Rückgang bei jung und alt ↓
Kim et al. (2007)	66 untrainierte junge/alte Männer/Frauen	16 Wochen Krafttraining	3x8-12 Wdh. Beinpresse und Beinstrecker; 3xwö.	Biopsie 24h nach Belastung RT-PCR	Myostatin, p21cip, p27cip, Cyclin B1 und D1,	Myo-mRNA sank um52%; Myo-Protein (50kDa)stieg um 44%
Kopple et al. (2006)	8 Hemodialyse- Patienten	Leichtes Ausdauertraining	9 Wochen	Biopsien RT-PCR	Myostatin mRNA, IGF1, IGF1R, ↑ IGFBPs	Myostatin mRNA ↓
Louis et al. (2007)	6 trainierte Sportler	Einmaliger Reiz	3x10 Wdh 10RM bzw. 30 min Laufen mit 75% VO2max	Biospien vor, nach und 1,2,4,8,12 und 24h post Training	Myostatin	Myo sank von 2,5fach bis 6,3fach stärkster Abfall nach 8h!

Autoren/ Jahr	N/ Geschlecht	Trainings- intervention	Belastungs- normative	Analyse/ Methoden	Gemessene Parameter	Myostatin- Expression
Marcell et al. (2001)	27 gesunde alte Männer	Vergleich von Myostatin und Hormonen	Keine Trainingsintervention	Biopsien RT-PCR	Myostatin, GHR, IGF1, AR	GH und Testo↓ negativ korreliert mit Myostatin↑
Reardon et al. (2001)	12 atrophe Hüftpatienten (4♂,8♀)	Vergleich zu Kontrollprobanden	Immobilisierte Hüftpatienten mit prae- und postoperativ	Biopsien vor und fünf Tage nach Hüft-TEP OP ATPase, HE, PCR	Myostatin,↑ IGF1, ↑ LIF, ↑ Atrophie ↑	Positive Korrelation Myostatin - Muskelatrophie
Roth et al. (2003)	15 alte und junge Männer und Frauen (7♂,8♀)	Unilaterales Kniestreckertraining (nur konzentrisch)	3x wö. Krafttraining HRT, 9 Wochen Training	Biopsien vor und 48- 72 h nach 9 Wochen	Myostatin mRNA	37% ↓ Alter und Geschlecht egal. Myostatinexpression keine Signifikanz zu Kraftzuwachs.
Schuelke et al. (2004)	1 Kind mit extremem Muskelwachstum	Keine Trainingsintervention	Case report			
Walker et al. (2004)	17 gesunde Männer	Ganzkörpertraining(GT) vs. Armbeugertraining(AB)	2x wö. Krafttraining bei 80% ORM, 10 Wochen Training	Plasmamessung prae-post, RIA, Western Analysis	Myostatin, IGF-1 →	SD 20% ↓ Kein sign.Unterschied GT zu AB
Willoughby	22 untrainierte	12 Männer Krafttraining	3x wö. Krafttraining bei 85-90% ORM, 12	mRNA und Protein	Myostatin mRNA und Protein,	mRNA und Protein: ↑

Autoren/ Jahr	N/ Geschlecht	Trainings- intervention	Belastungs- normative	Analyse/ Methoden	Gemessene Parameter	Myostatin- Expression
(2004)	Männer	der u. Extremitäten, 10 Kontrolle	Wochen Training		FLRG,↑ activinIb,↓ cortisol,↑ glucocorticoid receptor,↑ myofibrillar protein↑	
Zachwieja et al. (1999)	12 gesunde Männer	25 Tage Bettruhe mit 6° negativer Neigung	Vergleich vor und nach Bettruhe	Blutplasma, DEXA	Myostatin immunoreaktives Protein, LeanBodyMass↓	Plasma Myostatin um 12% ↑

Tabelle 8: Übersicht aller humanen Studien zur Myostatinregulation.

4.3 Muskelfaserdurchmesser

Die Vermessung des Muskelfaserdurchmessers zeigte im Gesamtkollektiv keine signifikanten Veränderungen. Wie im Kapitel 3.4 zu erkennen ist, herrscht in den Gruppen ein starker inter-individueller Unterschied bezüglich des SMD. Große Standardabweichungen der einzelnen Probanden ließen statistisch keine signifikante Aussage zu. Da zumindest in der Kraftgruppe ein gewisses Wachstum in Form einer Hypertrophie zu erwarten war, ist die Aussagekraft der Messmethoden in Frage zu stellen. Es stellt sich die Frage, ob die Untersuchungsmethode mit der geringen Gewebemenge valide ist, welche Fehlerindikatoren es zusätzlich bei solchen Biopsie Untersuchungen gibt und letztendlich auch, ob nach einem dreimonatigen Krafttraining überhaupt zwingend mit einer Hypertrophie (bei jungen Sportlern) zu rechnen ist. Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Aussagekraft von Muskelbiopsien. Fast alle Arbeitsgruppen sind sich dabei einig, dass die Muskelbiopsie zur Bestimmung des Muskelfaserdurchmessers ein sehr störungsanfälliges Verfahren ist. Folgende Fehlerquellen sind hier aufzuführen:

Bei der Entnahme des Muskelgewebes ist die Tiefe der Entnahmestelle nicht genau festzulegen, und deshalb sind geringe Abweichungen nicht ausgeschlossen. In der Untersuchung von Mahon et al. (1984) zeigten sich bei einigen Probanden signifikante Unterschiede zwischen den Faserdurchmessern einer Referenzbiopsie und einer an derselben Stelle entnommenen tieferen Gewebeentnahme. Eine weitere Problematik besteht darin, bei der Nachfolgebiopsie meist nicht die bestehende Narbe neu zu eröffnen sondern kurz unter oder über der Entnahmestelle zu schneiden. Bei der Präparation des Gewebes liegen die Fehlerquellen vor allem in der unterschiedlichen Geschwindigkeiten des Herunterkühlens der Proben im direkten Anschluss an die Muskelbiopsie (Halkjaer-Kistensen, Ingemann-Hansen 1981), sowie die im späteren Verlauf durch die Alkoholreihe vorgenommene Dehydratation (Blomstrand et al. 1984). Beide können zu unterschiedlich starken

Kontraktionen der Muskelfasern führen. Werden die gefärbten Schnitte im nächsten Schritt unter dem Mikroskop betrachtet, fällt auf, dass die Muskelfasern eines Typs starke Größenvariationen aufweisen. Diese Variationen werden in der Publikation von Blomstrand et al. (1984) deutlich. Es stellt sich somit die Frage, wie viele Muskelfasern vermessen werden müssen, um solche „Ausreißer“ statistisch zu relativieren und ob der Abstand zwischen den beiden Entnahmestellen eine Auswirkung auf die Faserdurchmesser hat. Hierzu liegen in der Literatur unterschiedliche Angaben vor. In der Studie von Willan et al. (2002) wurden Biopsien am musculus vastus lateralis im Abstand von 2,5 cm entnommen. Im Ergebnis waren die Fasern der proximalen Biopsie im Durchschnitt 12,5-20% größer. Mahon et al. kommen dagegen zu keinem einheitlichen Ergebnis. Obwohl sie die Biopsien im Abstand von 5 cm entnahmen konnten sie nur bei zwei von fünf Probanden signifikante Unterschiede zwischen den zwei Arealen feststellen. Simoneau et al. (1986) entnahmen die Biopsien, wie in unserer Studie, im Abstand von einem cm voneinander. Sie konnten dabei keine signifikanten Unterschiede im Querschnitt beider Biopsien erkennen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse kann letztendlich nicht klar gesagt werden, ob - und wenn inwiefern - sich die Entnahme an zwei Stellen des musculus vastus lateralis auf das Ergebnis auswirkt. Zur Frage, wie viele Fasern vermessen werden müssen, um einerseits einen Rückschluss auf Veränderungen des gesamten Muskels zu schließen und zum anderen den Einfluss von stark abweichenden Faserquerschnitten statistisch zu verringern, resümieren Always et al. (1989) in ihrer Studie, dass mindestens 200 Fasern gemessen werden müssen, um ein akzeptables Ergebnis im Sinne einer Validität zu erzielen. Lexell et al. (1989) empfehlen nach ihrer groß angelegten Studie am musculus vastus lateralis von 13 kurz zuvor verstorbenen männlichen Personen, so viele Fasern wie möglich zu vermessen. Eine Begründung findet sich in ihrer Studie anhand der so genannten „cross sectional area“. Dabei handelt es sich um die gesamte Fläche einzelner Fasern, die innerhalb einer definierten Region zwischen 480-1750 ccm der Typ I Fasern und 420-1440 ccm für die Typ II Fasern variierte. Genauere Angaben zur benötigten Muskelfasermenge versuchen McGuigan et

al. (2002) nach ihrer Untersuchung zu geben. Sie kommen zu dem Schluss, dass 50 Typ IIx, 200 Typ IIa und 150 Typ I Muskelfasern vermessen werden müssen, um die „cross-sectional area“ der jeweiligen Typen zu bestimmen. In der Diskussion warnen die Autoren vor falscher Interpretation der Ergebnisse. Die in dieser Arbeit vermessenen Faserquerschnitte liegen im Bereich von 60-100 Mikrometern und stimmen mit den in der Literatur gemessenen Größen überein (Ricoy et al. 1998, Trappe et al. 2000, Mahon et al. 1984). Da aufgrund der geringen Gewebemenge von ungefähr 30 - 50 mg aber im Durchschnitt nur ein Drittel an Muskelgewebe vergleichbarer Studien vorhanden war, konnten die Querschnitte nur von insgesamt circa 100 Muskelfasern pro Proband vermessen werden. Alle vorher genannten Studien sprechen dafür, dass diese Gewebemenge nicht ausreicht, um einen wissenschaftlich korrekten Vergleich zwischen Vor- und Nachtest zuzulassen. Die einzige Untersuchung, die für die Validität der Ergebnisse spricht, wurde von McCall et al. (1998) veröffentlicht. Nach ihrer Auffassung reichen pro Muskelfasertyp 50 Zellen aus, um ein valides Ergebnis im Bezug auf die Muskelfaserquerschnitte zu erhalten. Die methodisch bedingten Fehlerquellen, die einerseits auf der Entnahme und der histologischen Präparation, andererseits auf der geringen Biopsiemenge beruhen, lassen die Ergebnisse der nicht signifikanten Querschnittszunahme resultierend auf ein dreimonatiges Krafttraining nach intensiver Literaturrecherche nur wenig aussagekräftig erscheinen. Es stellt sich somit die Frage, ob nach einem solchen Krafttraining überhaupt zwingend mit einer Hypertrophie bei jungen Sportlern zu rechnen ist. Die Probanden waren zwar krafttrainingsunerfahren, es handelte sich jedoch um Sportstudenten, denen man eine Grundfitness und aufgrund der Anforderungen der meisten Sportarten auch eine gewisse Kraftfähigkeit der Beinmuskulatur attestieren muss. Betrachtet man verschiedene Krafttrainingsstudien, so zeigt sich, dass die meisten Untersuchungen die Wirksamkeit der jeweiligen Methode ausschließlich an Kraftmessungen oder der Zunahme der fettfreien Körpermasse festmachen. Die Zahl der Studien, die die Hypertrophie wirklich am jeweils trainierten Muskelquerschnitt messen, ist gering. Studien, die die Auswirkungen eines Krafttrainings im Bezug auf eine Muskelhypertrophie

untersuchen, wurden vor allem an älteren Probanden sowie an Personen mit chronischen Erkrankungen durchgeführt (Trappe et al. 2000, Hagerman et al. 2000, Hakkinen K, Hakkinen A 1995, Pyka et al. 1994). Das Ziel war es hierbei, die Möglichkeiten des Krafttrainings zur Vermeidung von Sarkopenie zu bestimmen, um somit die Mobilität und muskuläre Stabilität dieser Probanden zu verbessern. Bei Sportlern liegt das Interesse auf einem anderen Gebiet. Bei ihnen soll das Krafttraining die Leistungsfähigkeit verbessern, weshalb vor allem die Steigerung der Maximal-, Schnell- und Sprungkraft nach einer Trainingsmethode von Bedeutung ist (Peterson et al. 2004). Hierbei zählt besonders die Steigerung dieser Parameter mit möglichst geringer Muskelmassenzunahme. Daher wird zumeist auf die aufwendige Bestimmung der Hypertrophie verzichtet. In der Literatur wird häufig beschrieben, dass nach ca. vier Wochen, in denen Kraftsteigerungen vor allem auf neuronalen Adaptationen beruhen sollen, eine Hypertrophie der trainierten Muskulatur einsetzt (Steinacker et al. 2000). Betrachtet man die Ergebnisse der Studien, erkennt man, dass diese weitläufige Meinung nicht durch alle wissenschaftlichen Studien belegt werden kann. Fasst man die Untersuchungen zusammen, wird deutlich, dass am häufigsten bei älteren Personen nach einer Trainingsintervention von acht bis zwölf Wochen eine Hypertrophie gemessen werden konnte (Trappe et al. 2000, Hagerman et al. 2000, Hakkinen, K., Hakkinen, A. 1995, Pyka et al. 1994). Betrachtet man hingegen Studien mit jungen Probanden, sind die Ergebnisse nicht so eindeutig. Infolge des Krafttrainings wurden zwar teilweise signifikante Zunahmen gemessen (Kim et al. 2005, Ivey et al. 2000), jedoch gibt es ebenfalls Untersuchungen, bei denen keine signifikante Hypertrophie nach sechs bis achtwöchigem Training bestimmt werden konnte (Lüthi et al. 1986, Staron et al. 1994). Besonders interessant ist die Studie von Andersen et al. (1994) da ihr Trainingsdesign mit dem aus dieser Arbeit identisch ist. Hierbei handelte es sich um Sportler, genauer um Fußballspieler, die neben ihrem normalen Training dreimal wöchentlich ein Krafttraining mit 80% der Maximalkraft über zwölf Wochen durchführten. Nach Abschluss dieser Trainingsperiode konnte auch bei dieser Gruppe, identisch mit den Ergebnissen

dieser Arbeit, keine signifikante Zunahme des Muskelquerschnitts gemessen werden. Da die Studien kein einheitliches Ergebnis erbringen, besteht die Frage, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der Krafftähigkeit und dem Querschnitt des musculus quadriceps femoris gibt. Einige Studien haben diese Korrelation anhand von Computertomographie (Greig et al. 1993) und Ultraschall (Sipila, Suominen 1991) untersucht und bestätigt. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten daher darauf beruhen, dass die Kraftzunahme in manchen Studien zu gering war, um mit der jeweiligen Methode eine Hypertrophie messbar zu machen. Auch wenn die Vergleichbarkeit der Studien zwischen Kraftzunahme und Hypertrophiemessung aufgrund unterschiedlicher Messmethoden schwer fällt, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit zumindest die Vermutung zu, dass die Messbarkeit einer Hypertrophie auf Biopsieebene erst ab einer gewissen Kraftsteigerung gemessen werden kann. Die Probanden Nr. 2 und 33, bei denen die deutlichsten Zuwächse der Faserquerschnitte gemessen wurden, erzielten bei der Kraftmessung mit 797,29 N für Proband 2 und 737,71 N für Proband 33 die mit Abstand höchsten Kraftzuwächse im Nachtest. Gleichzeitig führten diese Kraftsteigerungen um circa 30%, die in anderen Studien noch höher ausfielen hier ebenfalls zu signifikanten Hypertrophien (Hagerman et al. 2000, Hakkinen et al. 2001). Die restliche Gruppe erzielte im Vergleich eine Kraftsteigerung von nur 244,6 N oder 10,3%. Solche Steigerungen resultierten in den Studien von Lüthi et al. (1986), Abe et al. (2000) und Hakkinen et al. (2001) ebenfalls in keiner signifikanten Zunahme der Faserquerschnitte. Diese Feststellung lässt sich durch wissenschaftliche Publikationen leider nicht weiter bestätigen, jedoch ist sie auffällig und eventuell eine Begründung für die nicht signifikante Steigerung der Faserquerschnitte der gesamten Gruppe, die aufgrund ihrer sportlichen Vorerfahrung im gegebenen Zeitraum geringere Kraftzuwächse erzielen konnte als untrainierte Personen in anderen Studien. Weiterhin bleibt zu bemerken, dass nicht jeder Mensch gleich auf einen Krafttrainingsreiz reagiert. Es scheint Phänotypen zu geben, die stärker mit einer Hypertrophie des Muskels auf Krafttrainingsreize reagieren als andere. Abschließend bleibt festzuhalten, dass zwar die Aussagekraft der

Biopsieauswertung infolge der beschriebenen methodischen Probleme, unter anderem der geringen Gewebemenge, angezweifelt werden kann, das Ergebnis aufgrund der sportlichen Vorerfahrung der Probanden letztendlich jedoch nicht zwingend im Widerspruch zu anderen wissenschaftlichen Untersuchungen steht.

4.4 Muskelfaserverteilung

Bei der Verteilung der Muskelfasertypen I, IIa und IIx stellte sich im Vorher-Nachher- Vergleich kein signifikanter Unterschied heraus. Ein so genannter „fiber-switch“ konnte nicht beobachtet werden. Dass sich die Muskelfaserausammensetzung durch ein Kraft- und Ausdauertraining mit submaximalen Belastungen verändern kann, bestätigen zahlreiche Untersuchungen. Die meisten Studien zeigen eine signifikante Abnahme der Typ IIx Muskelfasern (Andersen, Aagaard 2000; Bamman et al. 2003; Fry et al. 1994; Green et al. 1999; Hather et al. 1991; Kosek et al. 2006; Martel et al. 2006; Staron et al. 1994; Staron et al. 1990). Zusätzlich ergibt sich zumeist eine signifikante Zunahme der Typ IIa Fasern bei Krafttrainingsbelastungen und eine Zunahme von Typ I Fasern bei Ausdauerbelastungen. Muskelfasertyptransformationen sowie die Apoptose und Faserneogenese von Muskelfasern bestimmter Typen können Veränderungen in der Muskelfaserausammensetzung hervorrufen. Eine Transformation der Typ IIx Fasern zu Typ IIa / Typ I Fasern erscheint sinnvoll, da die zur sehr schnellen Kontraktion fähigen Typ IIx Fasern, die allerdings energetisch nur für kurze Anspannungszeiten optimiert sind, bei serieller Beanspruchung in eine energetische Notlage gelangen. Allgemein wird angenommen, dass besonders ein zur Ermüdung führendes Krafttraining - wie es in der Studie durchgeführt wurde - die Muskelfasertransformation in Richtung Typ IIx \rightarrow Typ IIa (\rightarrow Typ I) vorantreibt. Eine Transformation zu ermüdungswiderstandsfähigeren Muskelfasern scheint damit für das biologische System eine Möglichkeit zu sein, bei einem Krafttraining mit submaximalen Lasten und einer konstanten Leistungsfähigkeit dieser Fasern seine Gesamtleistung zu verbessern. Eine

Optimierung ist auch durch die Apoptose von Typ IIx Fasern und die Neogenese von Typ IIa (/ Typ I) Fasern denkbar. Über den Prozess der Apoptose ist bisher wenig bekannt. Ein Anstieg der Konzentration des Hormons Cortisol, welches die Bildung schneller MHCs hemmt oder eine Abnahme der Ausschüttung des Hormons Thyroxin, welches in geringen Konzentrationen die Bildung langsamer MHCs fördert, könnten auf die Neogenese der Muskelfasern nach Krafttrainingsbelastungen Einfluss haben (Kadi et al 2005, Steinacker et al. 2000).

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Veränderungen der Muskelfasertypen beobachtet werden, was wiederum evtl. mit dem Trainingszustand bzw. der Alltagsanforderung der Probanden zusammenhängen könnte. Die Probanden hatten eine langjährige sportliche Vorerfahrung und neben den spezifischen Trainingsreizen, die während der Interventionszeit gesetzt wurden, weitere sportliche Belastungen innerhalb ihres Sportstudiums zu tolerieren. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere trainingswirksame Reize während des Untersuchungszeitraums Einfluss auf die mögliche Faserausprägung der Beinmuskulatur hatten. So wurden beispielsweise auch in der Kontrollgruppe unspezifische Trainingsreize während der Interventionszeit durch die sportlichen Belastungen im Studium gesetzt. In weiteren Studien könnte man versuchen, durch die Mitwirkung unспортlicher Probanden, die mögliche Faserumverteilung durch Training genauer zu eruieren.

1. Messung von Follistatin und Myopro im Serum

Das Myostatin Propetid (Myopro) und das Follistatin (Folli) sind bekannt als potente Inhibitoren des Myostatingens (Bogdanovic et al. 2005). Um diese Antigene im Serum zu detektieren wurde eine besonders sensitive Methode der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) angewandt, die real-time Immuno-PCR (IPCR, Imperacer®) (Niemeyer et al. 2005). Mit Hilfe dieser Methode konnten im Serum der Probanden die Folli und Myopro Werte bestimmt werden (Diel et al. 2010).

Analog zu den Messergebnissen der mRNA Untersuchungen konnten auch hier keine signifikanten Veränderungen der Werte durch Training festgestellt werden (siehe Abb. 38).

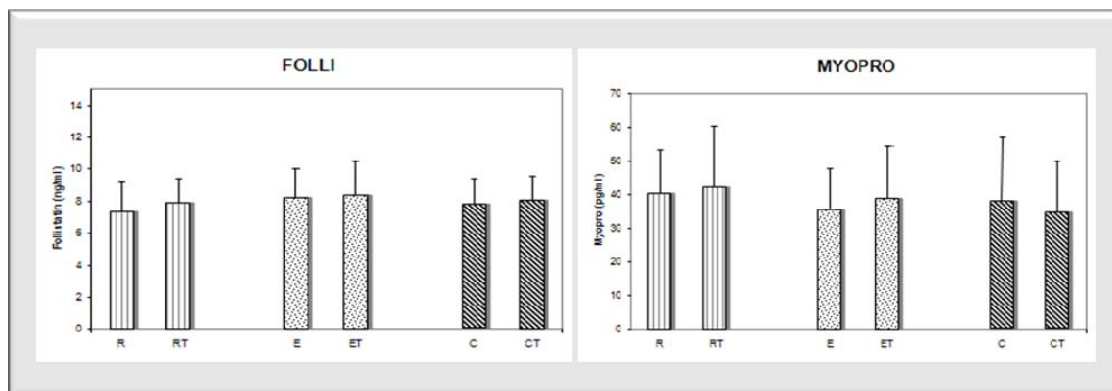


Abbildung 38: Keine signifikanten Veränderungen der Myopro und Folli Werte vor und nach den Trainingsinterventionen.

2. Satellitenzellproliferation

Bei der vorliegenden Arbeit wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen PCNA als Marker für den Nachweis proliferativer Satellitenzellen verwendet. PCNA ist als Teil des Zellzyklus bekannt und kann daher über ein geeignetes Antigen nachgewiesen werden (Johnson, Allen 1993). Das immunhistochemische Verfahren birgt jedoch einige Risiken. Durch die häufige Inkubation mit verschiedenen Substanzen und das Aufbringen und Absaugen des Puffers löste sich in manchen Färbedurchgängen Gewebe von den Objektträgern. Diesem Problem konnte teils durch Verwendung der speziellen Objektträger der Marke „Super-Frost+“ entgegen gewirkt werden. Das in Methoden beschriebene „festbacken“ der Schnitte auf den Objektträgern zeigte ebenfalls deutliche Wirkung gegen dieses Phänomen. Zur weiteren Vorbeugung könnte in Zukunft eine Fixierung des Gewebes mittels Citratpuffer und Autoklavierung durchgeführt werden. Dies würde die Auswertung erleichtern, da die gleichen Zellareale vollständiger wieder zu erkennen wären. Trotz Blockierung potentieller unspezifischer Antikörperbindestellen mit einer Block-Lösung für eine Stunde (5% BSA (Rinderalbumin) in TBS) (BSA, PAA

Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), kam es zu vereinzelt Färbungen an unvorhergesehenen Stellen im Zellverband und vereinzelt Färbungen der Satellitenzellen in den Negativkontrollen. Dies könnte auf Kreuzreaktionen zurück zu führen sein. Generell wirft dies die Frage auf, ob und wie viele Zellkerne durch Kreuzreaktionen in den PCNA- behandelten Proben gefärbt und als Satellitenzelle gewertet wurden. Auf Grundlage der gewonnenen Ergebnisse kann festgestellt werden, dass sich PCNA als Marker für Satellitenzellen erweist. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer relativ unkomplizierten Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit an in Paraffin eingebettetem Material. Das hauptsächliche Problem bei der Untersuchung der Biopsien lag an der Tatsache, dass die Gewebeproben der Eingangsuntersuchung keine Schnitte am Mikrotom zuließen. Das Gewebe war sehr porös und brüchig, und so gelangen keine verwertbaren Schnitte. Die Proben der Ausgangsuntersuchung ließen sich adäquat schneiden und verarbeiten. Daher konnte kein „vorher-nacher Vergleich“ angestellt werden. Die Ergebnisse können ergo nur im interindividuellen Vergleich gelten.

3. Abschliessende Betrachtung

Zusammengefasst ist festzustellen, dass es zwar funktionelle Verbesserungen der Trainingsgruppen gab, allerdings keine signifikanten morphologischen Veränderungen. So konnte beispielsweise keine Hypertrophie der Muskulatur in der Kraftgruppe festgestellt werden. Ob dies an der Messmethodik, dem Studiendesign oder dem Fitnesslevel der Probanden (junge Sportstudierende) lag, bleibt ungeklärt. Weiterhin konnte auch in der Analyse der Muskelbiopsien keine signifikante Veränderung der Myostatinwerte gemessen werden. Hier bleibt zu erwähnen, dass es unter den Probanden große interindividuelle Abweichungen gab und daher keine signifikanten Ergebnisse für die Trainingsgruppen errechnet werden konnten. Ob der Trainingszustand der Probanden bzw. der Entnahmezeitpunkt der Biopsien hier eine essentielle Rolle gespielt hat, könnte in weiteren Studien zum Thema geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen durchgeführt über die Regulation des Wachstumsfaktors Myostatin unter verschiedenen körperlichen Belastungen. Diverse Studien zeigten in der Vergangenheit sowohl eine gesteigerte Expression als auch eine verringerte Expression des Myostatingens als Reaktion auf verschiedene Belastungsreize. In dieser Studie sollte die Expression bzw. die Regulation des Myostatingens nach einem zwölf-wöchigem Kraft- oder Ausdauertraining mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Hierfür stellten sich 33 gesunde, sportliche Männer zur Verfügung. Das mittlere Alter betrug $22,2 \pm 1,8$ Jahre, das durchschnittliche Körpergewicht betrug $77,8 \pm 8$ kg, die durchschnittliche Körpergröße betrug $183,15 \pm 5,87$ cm. Die Probanden wurden randomisiert einer Ausdauer-, einer Kraft- und einer Kontrollgruppe zugeteilt. Die Trainingsgruppen trainierten über einen Zeitraum von zwölf Wochen und jeweils an drei nicht aufeinander folgenden Trainingstagen pro Woche. Das Ausdauertraining wurde mit einem Umfang von 45 Minuten pro Einheit und einer Intensität von 80% der aerob-anaeroben Schwelle durchgeführt. Das Krafttraining wurde mit einem Umfang von 8 Trainingsübungen zu je drei Sätzen und einer Intensität von ca. 80% der Maximalkraft zu je 10 Wiederholungen durchgeführt. Vor-, während und nach der Studie wurden sowohl Maximalkrafttests als auch ergometrische Leistungsuntersuchungen durchgeführt. Die Muskelbiopsien wurden vor und nach der Studie am rechten M. vastus lateralis entnommen. Als Parameter registrierten wir Maximalkraftwerte, Laktatwerte, Herzfrequenzwerte, maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}), Myostatinwerte, Muskelfaserdurchmesser, Muskelfaserzusammensetzung, Satellitenzellanzahl. Die wesentlichen Ergebnisse lauten:

- keine signifikante Veränderung des Myostatinwertes im Vergleich zum Ausgangswert
- signifikante Verbesserungen der Ausdauergruppe bei den Laktat- und Herzfrequenzwerten (Rechtsverschiebung)
- signifikante Verbesserungen der Kraftgruppe bei den Maximalkraftwerten

- keine signifikante Veränderung des Muskelfaserdurchmesser und der Muskelfaserverteilung

Aus den Befunden wird geschlossen, dass obwohl es zu einer funktionellen Anpassung der Probanden auf die spezifischen Reize gekommen ist, keine signifikante Veränderung des Myostatingehaltes im Muskel festgestellt werden konnte. Im Bereich der Anti-Doping Forschung ist diese Aussage als grundlegende Erkenntnis zu werten da Myostatin als Wachstumsregulator im Gen-Doping bereits in der Diskussion steht. Die Kernaussage der vorliegenden Studie lautet, dass bei mittelfristigem Training sportlicher Probanden keine signifikante Veränderung der Myostatinwerte in der mRNA nachzuweisen ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Abe T, De Hoyos DV, Pollock ML, Garzarella L. (2000) Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women. *Eur J Appl Physiol* 81 174-180.
2. Always SE, Grumbt WH, Gonyea WJ, Stray-Grundersen J. (1989) Contrasts in muscle and myofibers of elite male and female bodybuilders. *J Appl Physiol* 67 24-31.
3. Amali AA, Lin CJ, Chen YH, Wang WL, Gong HY, Lee CY, Ko YL, Lu JK, Her GM, Chen TT, Wu JL. (2004) Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev Dyn.* 229(4):847-56.
4. Andersen JL, Klitgaard H, Saltin B. (1994) Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiol Scand Jun*; 151 135-142.
5. Andersen JL, Aagaard P. (2000) Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 23(7):1095-104.
6. Baechle TR (EDS). National Strength and Conditioning Association - Essentials of strength and conditioning (2000) 2. Auflage. Champaign, Human Kinetics.
7. Baldwin KM. (2000) Research in the exercise sciences: Where do we go from here? *J Appl Physiol* 88: 332-336.
8. Bamman MM, Hill VJ, Adams GR, Haddad F, Wetzstein CJ, Gower BA, Ahmed A, Hunter GR. (2003) Gender differences in resistance-training-induced myofiber hypertrophy among older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 58(2):108-16.
9. Bell GJ, Syrotuik D, Martin TP, Burnham R, Quinney HA (2000) Effect of concurrent strength and endurance training on skeletal muscle properties and hormone concentrations in humans. *Eur J Appl Physiol* 81: 418-427.
10. Bergström J and Hultman E. (1966) The effect of exercise on muscle glycogen and electrolytes in normals. *Scand J Clin Lab Invest* 18: 16-20.
11. Bergström J. (1975) Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Invest* 35, pp. 609-616.
12. Bishop D, Jenkins DG, Mackinnon LT, McEniery M, Carey MF (1999) The effects of strength training on endurance performance and muscle characteristics. *Med Sci Sports Exerc* 31(6): 886-891.

13. Blomstrand E, Celsing F, Fridén J, Ekblom B. (1984) How to calculate human muscle fibre areas in biopsy samples – methodological considerations. *Acta Physiol Scand* 122 pp. 545-551
14. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, and Khurana TS. (2002) Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420: 418-421.
15. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Whittemore LA, Khurana TS. (2005) Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J. Apr*;19(6):543-9.
16. Borg GA (1974) Perceived exertion. *Exerc Sport Sci Rev* 2: 131-153.
17. Brook MH, Kaiser KK. (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23 pp. 369-379
18. Buel D. Rodgers and Dilip K. Garikipati (2008) Clinical, Agricultural, and Evolutionary Biology of Myostatin: A Comparative Review *Endocrine Reviews* 29 (5): 513-534.
19. Castelhana-Barbosa EC, Gabriel JE, Alvares LE, Monteiro-Vitorello CB, Coutinho LL (2005). Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development. *Growth Dev Aging* 69(1): 3-12.
20. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.* 2006 Jul;38(7):813-8.
21. Coffey VG, Shield A, Canny BJ, Carey KA, Cameron-Smith D, Hawley JA. (2006) Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290(5):E849-55.
22. Costa A, Dalloul H, Hegyesi H, Apor P, Csende Z, Racz L, Vaczi M, Tihanyi J. (2007) Impact of repeated bouts of eccentric exercise on myogenic gene expression. *Eur J Appl Physiol.*
23. Dickman S. (1997) Gene mutation provides more meat on the hoof. *Science* 277(5334): 1922-3.
24. Diel P, Schiffer T, Geisler S, Hertrampf T, Mosler S, Schulz S, Wintgens KF, Adler M. Analysis of the effects of androgens and training on myostatin propeptide and follistatin concentrations in blood and skeletal muscle using highly sensitive Immuno PCR. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Dec 15;330(1-2):1-9. Epub 2010 Aug 27.

25. Evans WJ, Phinney SD, Young VR (1982) Suction applied to a muscle biopsy maximizes Sample size. *Med Sci Sports Exercise* 14 pp. 101-102.
26. Forbes D, Jackman M, Bishop A, Thomas M, Kambadur R, Sharma M. (2006). Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J Cell Physiol* 206(1): 264-270.
27. Friedel A (2006). Molekulare Mechanismen der Skelettmuskeladaptation. *Disserationsschrift*. Köln.
28. Fry AC, Allemeyer CA, Staron RS (1994) Correlation between percentage fiber type area and myosin heavy chain content in human skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 68 83), 246-251.
29. Garg RR, Bally-Cuif L, Lee SE, Gong Z, Ni X, Hew CL, Peng C (1999) Cloning of zebrafish activin IIB receptor cDNA and mRNA expression of ActRIIB in emryos and adult tissues. *Mol Cell Endocrinol* 153: 169-181.
30. Garma T, Kobayashi C, Haddad F, Adams GR, Bodell PW, Baldwin KM. (2007) Similar acute molecular responses to equivalent volumes of isometric, lengthening, or shortening mode resistance exercise. *J Appl Physiol.* 102(1):135-43.
31. Glowacki SP, Martin SE, Maurer A, Baek W, Green JS, Crouse SF (2004) Effects of resistance, endurance, and concurrent exercise in training outcomes in men. *Med Sci Sports Exerc* 36(12): 2119-2127.
32. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S & Bhasin S. (1998) Organisation of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV infected men with muscle wasting. *Proc Natl Sci U S A* 95: 14938-14943.
33. Green H, Goreham C, Ouyang J, Burnett M, Ranney D. (1999) Regulation of fiber size, oxidative potential, and capillarization in human muscle by resistance exercise. *Am. J. Physiol.* 276, R591-R596.
34. Greig CA, Botella J, Young A. (1993) The quadriceps strength of healthy elderly people remeasured after eight years. *Muscle Nerve.* 16(1):6-10.
35. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, and Georges M. (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat Genet* 17: 71-74.
36. Hagerman FC, Walsh SJ, Staron RS, Hikida RS, Gilders RM, Murray TF, Toma, K, Ragg KE. (2000) Effects of high-intensity resistance training on untrained older men. I. Strength, cardiovascular, and metabolic responses. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55 B336-346.

37. Hakkinen K, Hakkinen A. (1995) Neuromuscular adaptations during intensive strength training in middle-aged and elderly males and females. In: *Electromyogr Clin Neurophysiol* 35 137-147.
38. Hakkinen K, Newton RU, Gordon SE, McCormick M, Volek JS, Nindl BC, Gotshalk LA, Campbell W, Evans WJ, Hakkinen A, Humphries BJ, Kraemer WJ. (1998) Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. *Med Sci* 53 B415-423.
39. Hakkinen K, Kraemer WJ, Newton RU, Alen M. (2001) Changes in electromyographic activity, muscle fibre and force production characteristics during heavy resistance/power strength training in middle-aged and older men and women. *Acta Physiol Scand* 171 51-62.
40. Halkjaer-Kristensen J, Ingemann-Hansen T. (1981) Variations in single fibre areas and fibre composition in needle biopsies from the human quadriceps muscle. *Scand J clin Lab Invest* 41 pp. 391-395.
41. Hather BM, Tesch PA, Buchanan P, Dudley GA (1991) Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiol. Scand.* 143 (2), 177-185.
42. Hickson RC, Dvorak BA, Gorostiaga EM, Kurowski TT, Foster C (1988) Potential for strength and endurance training to amplify endurance performance. *J Appl Physiol* 65(5): 2285-2290.
43. Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, and Wolfman NM. (2003) Regulation of myostatin in vivo by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* 17: 1144-1154.
44. Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. (2010) Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Med Sci Sports Exerc.*42(11):2023-9.
45. Hoff J, Helgerud J, Wisloff U. (1999) Maximal strength training improves work economy in trained female cross-country skiers. *Med Sci Sports Exerc* 31(6): 870-877.
46. Huet C, Li ZF, Liu HZ, Black RA, Galliano MF, and Engvall E. (2001) Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases; myostatin as a potential mediator. *Am J Physiol* 281: C1624-C1634.
47. Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Kaasalainen T, Pollanen E, Hakkinen K, Alen M, Selanne H, Kovanen V, Mero AA. (2007) Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. *Med Sci Sports Exerc.* 39(2):289-97.

48. Ivey FM, Roth SM, Ferrell RE, Tracy BL, Lemmer JT, Hurlbut DE, Martel GF, Siegel EL, Fozard JL, Jeffrey Metter E, Fleg JL & Hurley BF. (2000) Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: M641-M648.
49. Izquierdo M, Häkkinen K, Ibanez J, Kraemer WJ, Larrion JL, Gorostiaga EM (2005) Effects of combined resistance and cardiovascular training on strength, power, muscle cross-sectional area, and endurance markers in middle-aged men. *Eur J Appl Physiol* 94: 70-75.
50. Jency NE, Sims JK, Dieli-Conwright CM, Sattler FR, Rice JC, Schroeder ET. (2010) Exercise does not influence myostatin and follistatin messenger RNA expression in young women. *J Strength Cond Res.*24(2):522-30.
51. Jung AP (2003) The impact of resistance training on distance running performance. *Sports Med* 33(7): 539-552.
52. Johnson SE, Allen RE. (1993) Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Is Expressed in Activated Rat Skeletal Muscle Satellite Cells. *J Cell Physiol* 154: 39-43.
53. Kadi F. (2005) Hormonal and growth factor-related mechanism involved in the adaptation of skeletal muscle to exercise in Kraemer WJ, Rogol AD (EDS): *The endocrine system in sports and exercise.* 309-310. Massachusetts, Oxford, Carlton: Blackwell Publishing.
54. Kim JS, Cross JM, Bamman MM. (2005) Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(6):E1110-9
55. Kim JS, Petrella JK, Cross JM, and Bamman MM (2007) Load-mediated downregulation of myostatin mRNA is not sufficient to promote myofiber hypertrophy in humans: a cluster analysis *J Appl Physiol* 103: 1488–1495.
56. Knauth R, Diel P, Hegele-Hartung C, Engelhaupt A, Fritzemeier KH. (1996) Sexual dimorphism of steroid hormone receptor messenger ribonucleic acid expression and hormonal regulation in rat vascular tissue. *Endocrinology.*137(8):3220-7.
57. Kopple JD, Cohen AH, Wang H, Qing D, Tang Z, Fournier M, Lewis M, Casaburi R, Storer T. (2006) Effect of exercise on mRNA levels for growth factors in skeletal muscle of hemodialysis patients. *J Ren Nutr.*16(4):312-24.
58. Kopple JD, Wang H, Casaburi R, Fournier M, Lewis MI, Taylor W, Storer TW. (2007) Exercise in maintenance hemodialysis patients induces

transcriptional changes in genes favoring anabolic muscle. *J Am Soc Nephrol.* 18(11):2975-86.

59. Kos K, Coulombe JN (1997) Activin receptor mRNA expression by neurons of the avian ciliary ganglion. *J Neurobiol* 32: 33-44.
60. Lee SJ and McPherron AC. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9306-9311.
61. Kosek DJ, Kim JS, Petrella JK, Cross JM, Bamman MM.(2006) Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. *J. Appl. Physiol.* 101 (2), 531-544.
62. Lexell J, Taylor CC. (1989) Variability in muscle fiber areas in whole human quadriceps muscle: how to reduce sampling errors in biopsy techniques. *Clin Physiol* 9 333-343.
63. Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. (2007) Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 103(5):1744-51.
64. Lüthi JM, Howald H, Claassen H, Rösler P, Vock P, Hoppeler H. (1986) Structural Changes in Skeletal Muscle Tissue with Heavy-Resistance Exercise. *Int J Sports Med*, 7 123-127.
65. Mabuchi K, Sréter FA. (1980) Actomyosin ATPase. I. Quantitative measurement of activity in cryostat sections. *Muscle & Nerve* 3 pp. 227-232.
66. Mabuchi K, Sréter FA. (1980) Actomyosin ATPase. II. Fiber typing by histochemical ATPase reaction. *Muscle & Nerve*, 3 pp. 233-239.
67. Mader A, Liesen H, Heck H, Philippi H, Rost R, Schürch P, Hollmann W (1976) Zur Beurteilung der sportartspezifischen Ausdauerleistungsfähigkeit im Labor. *Sportarzt Sportmed* 4: 80.
68. Mader A, Heck H, Föhrenbach R, Vassiliades A, Hollmann W (1989) Eine Methode zur indirekten rechnerischen Schätzung der Gesamtstoffwechsellkapazität aus dem Verhältnis von maximalem Nachbelastungslaktat und Laufgeschwindigkeit mittels einer Kombination von zwei- und mehrstufigen anaeroben Tests auf differenten Laufstrecken mit zwischenzeitlicher vollständiger Erholung. 31. Deutscher Ärztekongress: 380-394.
69. Mahon M, Toman A, Willan PLT, Bagnall KM. (1984) Variability of histochemical and morphometric data from needle biopsy specimens of human quadriceps femoris muscle. *J Neurol Sci*, 63 pp. 85-100.
70. Martel GF, Roth SM, Ivey FM, Lemmer JT, Tracy BL, Hurlbut DL, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA (2006) Age and sex affect human muscle fibre

adaptations to heavy-resistance strength training. *Exp. Physiol.* 91 (2), 457-464.

71. McCall GE, Byrnes WC, Dickinson AL, Fleck SJ. (1998) Sample size required for the accurate determination of fiber area and capillarity of human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 23 594-599.
72. McGuigan RM, Kraemer WJ, Deschenes MR, Gordon SE, Kitaura T, Scheett TP, Sharman MJ, Staron SR. (2002) Statistical analysis of fiber area in human skeletal muscle. *Can J Appl Physiol* 27 415-422.
73. Marcell TJ, Harman SM, Urban RJ, Metz DD, Rodgers BD & Blackman MR. (2001) Comparison of GH, IGF-1, and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1159-E1164.
74. Marcinik EJ, Potts G, Schlabach G, Will S, Dawson P, Hurley BF. (1991) Effects of strength training on lactate threshold and endurance performance. *Med Sci Sports Exerc* 23: 739-743.
75. McPherron AC, Lawler AM, and Lee SJ. (1997a) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387: 83-90.
76. McPherron AC and Lee SJ. (1997b) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12457-12461.
77. Mosher DSP, Quignon CD, Bustamante NB, Sutter CS, Mellersh HG, Parker E, Ostrander AE. (2007) A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet* 3(5): e79.
78. Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE. (1990) Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*. 13;29(45):10351-6.
79. Niemeyer CM, Adler M, Wacker R. (2005). Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol* 23: 208-216.
80. Paavolainen L, Hakkinen K, Hamalainen I, Nummela A, Rusko H (1999) Explosive strength training improves 5km running time by improving running economy and muscle power. *J Appl Physiol* 86(5): 1527-1533.
81. Patel K, Amthor H. (2005) The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscular disorders* 15, 117-126.

82. Peterson MD, Rhea MR, Alvar BA. (2004) Maximizing strength development in athletes: a metaanalysis to determine the dose-response relationship. *J Strength Cond Res* 18 377-382.
83. Pyka G. (1994) Muscle strength and fiber adaptations to a year-long resistance training program in elderly men and women. *J Gerontol* 49 M22-27.
84. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P & Byrne E. (2001) Myostatin, insulinlikegrowth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24: 892-899.
85. Ricoy JR, Encinas AR, Cabello A, Madero S, Arenas J. (1998) Histochemical study of the vastus lateralis muscle fibre types of athletes. *J Physiol Biochem* 54 41-47.
86. Romeis B. (1989) *Mikroskopische Technik*. Urban und Schwarzenberg Verlag, München- Wien- Baltimore.
87. Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF & Rogers MA (2003) Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med* 228: 706-709.
88. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF & Lee SJ. (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350: 2682-2688.
89. Simoneau JA, Lortie G, Boulay MR, Thibault MC, Bouchard C. (1986) Repeatability of fibre type and enzyme activity measurements in human skeletal muscle. *Clin Physiol* 6 347-356.
90. Sipilä S, Suominen H. (1991) Ultrasound imaging of the quadriceps muscle in elderly athletes and untrained men. *Muscle Nerve*. 1991 527-33.
91. Staron RS, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, Hagerman FC, Hikida RS. (1994) Skeltal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J Appl Physiol* 73 1247-1255.
92. Steinacker JM, Lormes W, Lehmann M, Liu Y. (2000) Molekulare Effekte von körperlicher Belastung und Stress auf den Skelettmuskel – Beispiel periphere arterielle Verschlusskrankheit. *Dtsch Z Sportmed* 51, Nr.1 11-20.
93. Steinacker JM, Wang L, Lormes W, Reißnecker S, Liu Y. (2002) Skeletal muscle plasticity and training. *Dtsch Z Sportmed* 53, Nr. 12 354-360.

94. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ & Brenner CA. (1999) Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 5: 1034-1039.
95. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, and Kambadur R. (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275: 40235-40243.
96. Trappe S, Williamson D, Godard M, Porter D, Rowden G, Costill D. (2000) Effect of resistance training on single muscle fiber contractile function in older men. *J Appl Physiol* 89:143-152.
97. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, Flanigan KM, Pestronk A, Tawil R, Wolfe GI, Eagle M, Florence JM, King WM, Pandya S, Straub V, Juneau P, Meyers K, Csimma C, Araujo T, Allen R, Parsons SA, Wozney JM, Lavallie ER, Mendell JR. (2008) A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 63(5):561-71.
98. Walker KS, Kambadur R, Sharma M, Smith HK. (2004) Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. *Med Sci Sports* 36:787-793.
99. Willan PLT, Ransome JA, Mahon, M. (2002) Variability in human quadriceps muscles: Quantitative study and review of clinical literature. *Clin Anat* 15: 116-128.
100. Willoughby DS. (2004) Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc* 36: 574-582.
101. Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J, Gonzalez-Cadavid NF. (2002). Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J Nutr Health Aging* 6(5): 343-8.
102. Zachwieja JJ, Smith SR, Sinha-Hikim I, Gonzales-Cadavid N & Bhasin S. (1999) Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J Gravit Physiol* 6: 11-15.
103. Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, Tidball JG, McNally EM. (2000) "Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle." *FEBS Lett* 474(1): 71-5.

Abkürzungsverzeichnis

1RM:	One Repetition Maximum
°C:	Grad Celsius
µl:	Mikroliter
A. dest:	Aqua destillatum
ADP:	Adenosindiphosphat
ActRIIA:	Activin Typ II Rezeptor
ATP:	Adenosintriphosphat
ATPase:	Adenosintriphosphatase
bp:	Basenpaare
BSA:	bovine serum albumin
cm:	Zentimeter
cDNA:	komplementäre DNA
cyc:	Cyclophilin
DEPC:	RNase freies Wasser
DTT:	Dithiothreitol
Et al.:	et alii
EtBr:	Ethidiumbromid
FLRG:	follistatin related gene
g:	Gramm
GASP-1:	growth and differentiation factor-associated serum protein -1
GDF-8:	growth differentiation factor 8
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HE:	Hämalaun-Eosin
Hz:	Hertz
IGF:	insulin-like-growth-factor
kDa:	kilo Dalton / atomare Masseinheit
km/h:	Kilometer pro Stunde
kg:	likogramm
L:	Liter
M:	Mol

mM:	Millimol
MgCl ₂ :	Magnesiumchlorid
MHC:	Myosinschwerketten
ml:	Milliliter
m/s:	Meter pro Sekunde
mmol/l:	millimol pro liter
mRNA:	messenger-RNA / Boten-RNA
MW:	Mittelwert
N:	Newton
PCNA:	proliferating cell nuclear antigen
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pH:	Wasserstoffionenpotenz (pondus Hydrogenii)
RNA:	Ribonukleinsäure
RQ:	Respiratorischer Quotient
SD:	Standardabweichung
Smad7:	Mothers against decapentaplegic homolog 7
TBS:	Triphosphatpuffer
TGF-β:	transforming growth factors-β
V:	Volt
VCO ₂ :	Volumen Kohlendioxid
VO ₂ :	Volumen Sauerstoff

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Stammzelle zur Muskelzelle	3
Abbildung 2: Myostatin Knock-Out Maus „Mighty mouse“ neben Wildtyp(links); Wildtyp in der linken Spalte, Follistatineinfluß in der mittleren Spalte, Myostatin Knock-Out Maus in der rechten Spalte(rechts).	5
Abbildung 3: „Belgian Blue Cattle“ Bulle mit Myostatindefekt.	6
Abbildung 4: Texelschaaf mit Myostatindefekt.	6
Abbildung 5: Whippet Dog Wildtyp (links), Whippet Dog mit heterozygotem Myostatindefekt (mitte), „Bully“ Whippet Dog mit homozygotem Myostatindefekt (rechts).....	7
Abbildung 6: Neugeborenes Kind mit Myostatindefekt (links), 7 Monate altes Kind mit Myostatindefekt (rechts).	9
Abbildung 7: Angeblicher Myostatinblocker frei im Internet erhältlich, Wirkstoff: cystoseira canariensis	10
Abbildung 8: Zeitverlauf der Studie von Woche 0 bis Ende der 15. Woche.	14
Abbildung 9: Isometrische Maximalkraftmessung bei einem Kniewinkel von 120°.	17
Abbildung 10: Laufbandtest mit spirometrischer Messung	19
Abbildung 11: Laktatanalysegerät „BIOSEN C_line©“ der Firma EKFDiagnostic GmbH mit portablem Drucker und Laktatprobenhalter.....	20
Abbildung 12: Muskel-Biopsienadel nach BERGSTRÖM (1975)	21
Abbildung 13: Modifizierte Biopsienadel (EVANS 1982)	22
Abbildung 14: ATPase Färbung dieser Arbeit nach MABUCHI/SRETER (1980). Vorinkubation mit pH 4,5. Weiß: Typ IIa, Schwarz: Typ I und intermediär Typ IIx	24
Abbildung 15: Behandlungsprotokoll zur ATPase Färbung	26
Abbildung 16: Muskelfaserquerschnittbestimmung	27
Abbildung 17: Das Prinzip der Real-Time PCR.....	37
Abbildung 18: Die Darstellung eines originalen Computerdiagramms des iCycler® IQ Real Time Detection Software V 2.1 zeigt eine Abbildung der Schmelzkurve von Cyclophilin (links) und Myostatin (rechts).	38
Abbildung 19: Mittelwerte und Standardfehler der absoluten statischen Kraft [N] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).....	51

Abbildung 20:	Mittelwerte und Standardfehler der relativen statischen Kraft [N] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).....	51
Abbildung 21:	Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der maximalen relativen Sauerstoffaufnahme (VO ₂ max) der einzelnen Gruppen (Kraft, Ausdauer, Kontrolle) im Eingangs- (prae) und Endtest (post).....	53
Abbildung 22:	Mittelwerte und Standardfehler der Laktatwerte [mmol/l] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).....	53
Abbildung 23:	Mittelwerte und Standardfehler der Herzfrequenzen [S/min] der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).	56
Abbildung 24:	Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = (2 ^{-ddCT}); 7 Probanden der Kraftgruppe im prae/post Vergleich.....	58
Abbildung 25:	Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = (2 ^{-ddCT}) 7 Pobanden der Ausdauergruppe im prae/post Vergleich.....	59
Abbildung 26:	Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = (2 ^{-ddCT}) 8 Pobanden der Kontrollgruppe im prae/post Vergleich.....	60
Abbildung 27:	Myostatin mRNA Gehalt im rechten M. vastus lateralis; normalisiert gegen das Referenzgen 1A. Foldinduction = (2 ^{-ddCT}) 8 Pobanden der aller Gruppen im vergleich (prae/post).	61
Abbildung 28:	Vergleich der Probanden der Kraftgruppe bezüglich Faserdurchmesser „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.	62
Abbildung 29:	Faserdurchmesser der Kraftgruppe „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.	63
Abbildung 30:	Vergleich der Probanden der Ausdauergruppe bezüglich Faserdurchmesser „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.	63
Abbildung 31:	Faserdurchmesser der Ausdauergruppe „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.	64

Abbildung 32:	Vergleich der Probanden der Kontrollgruppe bezüglich Faserdurchmesser „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.	65
Abbildung 33:	Faserdurchmesser der Ausdauergruppe „prae-post“. Schwarz:Typ1-Fasern, Beige: Typ2a-Fasern, Grau: Typ2x-Fasern.	65
Abbildung 34:	Muskelfaserverteilung in Prozent des rechten M vastus lateralis vor und nach einem 12 wöchigem Krafttraining.	66
Abbildung 35:	Muskelfaserverteilung in Prozent des rechten M vastus lateralis vor und nach einem 12 wöchigem Ausdauertraining.	67
Abbildung 36:	Muskelfaserverteilung in Prozent des rechten M vastus lateralis vor und nach der Studie.	68
Abbildung 37:	zeigt die prozentualen Anteile noch gefärbter Zellkerne bei den PCNA-Färbungen gegenüber den HE-Färbungen. Mittelwert und Standartabweichung der Prozentangaben der Kontroll-, Kraft und Ausdauergruppe.	69
Abbildung 38:	Keine signifikanten Veränderungen der Myopro und Folli Werte vor und nach den Trainingsinterventionen.	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anthropometrische Daten der Probanden (Alter, Größe, Gewicht) und deren Hauptsportart vor Studienbeginn (durchschnittlich 2-3 TE/Woche).....	13
Tabelle 2:	Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der absoluten [N] und relativen statischen Kraft [N/kgKG] der Kraft-, Ausdauer-, und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).	50
Tabelle 3:	Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der maximalen relativen Sauerstoffaufnahme (VO ₂ max) der einzelnen Gruppen (Kraft, Ausdauer, Kontrolle) im Eingangs- (prae) und Endtest (post).....	52
Tabelle 4:	Mittlere Laktatwerte [mmol/l] und Standardabweichungen (SD) der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe zu Beginn des Stufentests (Ruhe) und in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).	54
Tabelle 5:	Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Geschwindigkeiten [km/h] an den 2 und 4 mmol/l Laktatschwellen der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).	55
Tabelle 6:	Mittlere Herzfrequenzen [S/min] und Standardabweichungen (SD) der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe zu Beginn des Stufentests (Ruhe) und in den einzelnen Laufstufen [km/h] im Eingangs- (prae) und Endtest (post).	57
Tabelle 7:	Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Herzfrequenzen an den 2 und 4 mmol/l Laktatschwellen der Kraft-, Ausdauer- und Kontrollgruppe im Eingangs- (prae) und Endtest (post).....	57
Tabelle 8:	Übersicht aller humanen Studien zur Myostatinregulation.....	82

Lebenslauf

Name: Stephan Geisler
Geburtsdatum / -ort: 4. April 1977 in Solingen
Anschrift: Luxemburgerstr. 278a,
50937 Köln
Familienstand: ledig
Kinder: keine

Schulausbildung

1983 bis 1987 Grundschole Wienerstraße Solingen
1987 bis 1997 Gymnasium Schwertstraße Solingen

Wehrdienst

1997 bis 1998 Luftwaffe Köln Porz/Wahn

Studium

1999 - Juni 2003 Sportstudium, Deutsche Sporthochschule Köln
2005 – 2011 Promotionsstudium DSHS Köln

Studienbegleitende wissenschaftliche Tätigkeiten

2002 Wissenschaftliches Projekt: Sport mit älteren
Menschen
2006 Erarbeitung der „Kraft-Fitness Trainerfortbildung“

Berufliche Tätigkeit

1998 bis 2002 Sportlicher Leiter des Fitnessclubs „Pro Aktiv“
Juli bis September 2002 Sporttherapie – Burger Land Klinik Solingen (Dr.
Frank Duisberg)
2002 bis jetzt Lehrbeauftragter der Deutschen Sporthochschule
Köln im Bereich Krafttraining/Gewichtheben
2003 bis jetzt Ausbildungsreferent bei Trainerausbildungen im
Bereich Fitness/Gesundheitssport (Safs&Beta –
Trainerakademie)
2006 bis jetzt Ausbildungsleiter „Fitness-Kraft Trainer“ an der
DSHS
2007 bis 2009 Sporttherapeut im Medisport Landwehr (Teilzeit)
2007 bis jetzt Referent im betrieblichen
Gesundheitsmanagement.

Zusätzliche Qualifikationen

1997	Erwerb der Fitnesstrainer B- und A- Lizenz
2009	Fortbildung „sanfte Chiropraktik“
2010	Fortbildung Fasziale Distorsions Methode

Literaturliste

Geisler S: Verletzungen und Überlastungsschäden beim Fitnessstraining – Eine Fragebogenerhebung. Diplomarbeit, Köln (2003)

Geisler S, Schiffer T: Exercise Induced pain with fitnessstraining. Kongressband ECSS 2007

Geisler S, Schiffer T, Diel P, Strüder HK: Functional and morphological effects of strength and endurance training in healthy young men. Kongressband ECSS 2007

Geisler S, Brinkmann C, Schiffer T, Kreutz T, Bloch W, Brixius K: The influence of resistance training on patients with metabolic syndrome - Significance of changes in muscle fiber size and muscle fiber distribution. J. Strength Cond. Res. accepted (2010)

Hollmann W, Schiffer T, Rojas Vega S, Diehl J, Geisler S, Schulte S, Strüder HK: Einfluss unterschiedlicher Trainingsqualitäten auf den neurotrophen Faktor BDNF und den insulinähnlichen Wachstumsfaktors IGF-1. Jahresbericht BISP Jahrbuch 2007

Diel P, Schiffer T, Geisler S, Hertrampf T, Mosler S, Schulz S, Wintgens KF, Adler M.: Analysis of the effects of androgens and training on myostatin propeptide and follistatin concentrations in blood and skeletal muscle using highly sensitive Immuno PCR. Mol Cell Endocrinol. 2010 Dec 15;330(1-2):1-9. Epub 2010 Aug 27.

Drittmittelprojekte

Forschungsförderung der DSHS Köln 2005 zum Thema „Sportmedizinische Interventionsmöglichkeiten bei Skelettmuskelatrophie im Alter und durch körperliche Inaktivität“.

Sportlicher Werdegang

1987-1997	Teilnahme an den Verbandsspielen der Bezirksliga im Tischtennis (TTC Fortuna Solingen)
1990 – jetzt	Aktiver Kraft- und Fitnesssportler
2005	Erfolgreiche Teilnahme am 7. Ford Köln Marathon

Abstract:

Myostatin oder GDF8 is a negative regulator of skeletal muscle mass but its role in human skeletal muscle is insufficiently described. The aim of this study was to examine the effects of strength and endurance training on myostatin mRNA in the vastus lateralis muscle of healthy and physically active humans. 33 healthy and physically active sports students (static and dynamic knee extensor strength 33 ± 4.5 N/kgBW; 1185 ± 170 W, respectively; maximum oxygen uptake 52.5 ± 8 ml/kgBW/min) were recruited and randomly assigned to a moderate endurance training group (n=11), a strength training group (n=11) and a control group (n=11). Muscle biopsies were taken from the vastus lateralis muscle 2-3 days before the start as well as at the end of the 12 weeks' training period. Exercise-specific functional improvements after moderate endurance training and strength training were measured for submaximal endurance and for static and dynamic strength of the knee extensor muscles. None of the myostatin mRNA values showed significant pre-post differences or group-specific differences. These results are in contrast to data with sedentary subjects, suggesting that myostatin is necessary for adaptations of skeletal muscle to exercise stress. We conclude that functional improvements after moderate endurance training and strength training can occur without alterations in myostatin mRNA in physically active humans.

Kurzbeschreibung:

Myostatin oder auch GDF8 ist ein negativer Regulator der Skelettmuskel-Masse. Allerdings ist dessen Expression als Reaktion auf Training bisher nur unzureichend beschrieben worden. Das Ziel dieser Studie war es den Effekt von Kraft- und Ausdauertraining auf die Regulation der Myostatin mRNA bei gesunden und aktiven Männern zu untersuchen. Dazu wurden 33 männliche Sportstudenten (statische und dynamische Knie-Extensor Kraft: 33 ± 4.5 N/kgKG; 1185 ± 170 W; Maximale Sauerstoffaufnahme: 52.5 ± 8 ml/kgKG/min)

randomisiert in eine Ausdauergruppe (n=11), Kraftgruppe (n=11) oder Kontrollgruppe (n=11) eingeteilt! Muskelbiopsien wurden 2-3 Tage vor und nach der zwölf-wöchigen Trainingsintervention am M. vastus lateralis entnommen. Funktionelle Steigerungen der Maximalkraft und des Ausdauerleistungsvermögens konnten in den jeweiligen Trainingsgruppen nachgewiesen werden ($p < 0,01$). Die mRNA Analysen aller Gruppen ergaben keine signifikanten Veränderungen im prae-post Vergleich. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen anderer Arbeitsgruppen, bei denen eher unспортliche und ältere Probanden auf eine Myostatin-Regulation untersucht worden sind. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass funktionelle Steigerungen der Kraft- und Ausdauerfähigkeiten als Reaktion auf ein Training nicht in einem signifikanten Zusammenhang mit einer Myostatin-Regulation der mRNA bei gesunden sportlichen Männern stehen.