

Mairbörl H

## Regelung der Genexpression im Muskel bei Belastung

### *Regulation of Gene Expression in Muscles under Exercise*

Sportmedizin, Medizinische Klinik VII, Universitätsklinikum Heidelberg

#### Zusammenfassung

Der Skelettmuskel zeigt eine enorme Plastizität als Anpassung an körperliche Belastung. Damit wird der Muskel so verändert, dass Energiebereitstellung, Leistungsfähigkeit, Kraft und Ausdauer gesteigert werden. Nur einige der vielfältigen Mechanismen, die diese Änderungen in Struktur und Funktion auslösen, sind bisher bekannt. Sie beinhalten neben akuter Regulation der Aktivität von Stoffwechsellenzymen während der Belastung eine Änderung der Transkription und Translation, aber auch posttranslationale Modifikation der neu synthetisierten Proteine. Die Untersuchung zur Erfassung dieser Vorgänge sollten möglichst viele Anpassungsebenen erfassen um Signalkaskaden zu charakterisieren. Idealerweise untersucht man „CASSETTES“, also Gruppen von Proteinen, deren Neusynthese und Funktionszustand durch bestimmte Transkriptionsfaktoren und Regelmechanismen kontrolliert werden, und die auch koordinierte Aufgaben erfüllen (z.B. HIF-1 $\alpha$  abhängige Transkription zur Anpassung der O<sub>2</sub>-Versorgung und des Stoffwechsels). Eine wichtige Voraussetzung zum Erreichen einer hohen Aussagekraft ist das Studiendesign um z.B. Anpassung durch Substratverarmung von mechanischer Beanspruchung, oder um Aufbaumechanismen nach Muskelruhistellung vom Aufbau des bereits trainierten Muskels zu trennen. So wird die Transkription bereits während einer Belastung stimuliert, wozu bereits kurze Belastungen reichen. Die geänderte Transkription hält genspezifisch unterschiedlich lange nach der Belastung an. Auslöser der Änderung der Genexpression sind Stoffwechselgrößen wie AMP, Glykogen-Verarmung, sowie Hypoxie, aber auch mechanische Reize und die belastungsinduzierte Zunahme des intrazellulären Ca, die alle unabhängig von einander aber auch komplex vernetzt die Genexpression und so die Ausprägung eines Fasertypus auslösen.

**Schlüsselwörter:** Fasertypus, Zellstoffwechsel, Mitochondrien, Transkriptionsfaktoren, Calcium, Training, akute Belastung

#### Einleitung

Bewegung im Alltag im Rahmen unserer üblichen Tätigkeiten und körperliche Belastung im Sport sind Stimuli zur Anpassung unseres Organismus an die jeweilige Belastung. Die Anpassungsmechanismen setzen bereits während der Belastung ein, laufen dann aber vorwiegend in der Erholungsphase ab. Sie beinhalten die Regelung der Aktivität einzelner Enzymsysteme zur Optimierung der Versorgung während der Belastung und in der Folge „strukturelle“ Anpassung durch Stimulierung der Genexpression. Die Zeitgänge für einzelne Anpassungsmechanismen sind ganz unterschiedlich.

Die akute und die Langzeit-Anpassung betreffen praktisch alle Systeme des Organismus. Die wichtigsten sind

#### Summary

Skeletal muscle is characterized by an enormous plasticity in adjustments to muscular exercise to increase ATP-production, work capacity, force development and endurance. Mechanisms of adjustment are not well understood. They include acute adjustments of enzyme activity during exercise as well as altered transcription and translation, but also post-translational modifications of newly-synthesized proteins. Methodological approaches should cover as many levels of adjustment as possible for optimal characterization of signalling cascades. Ideally, “cassettes” are studied, which are groups of proteins whose synthesis and function are controlled by certain transcription factors and regulatory mechanisms, and which fulfil coordinated tasks (e.g. HIF-1 $\alpha$  dependent transcription for the adjustment of oxygen delivery and metabolism). Requisite to successful research is a study design able to distinguish adjustments caused by metabolic depletion from mechanical strain, or upregulation of transcription after immobilization from build-up in an already-trained muscle. Gene expression is already stimulated during short-term exercise. The duration of increased transcriptional activity after exercise differs among genes. Gene expression is stimulated by increased concentrations of AMP, depletion of glycogen stores, by hypoxia, but also by mechanical stimuli and the exercise-induced increase in intracellular Ca. Each of these mechanisms can stimulate gene expression independently, but also complex interactions among different stimuli have been observed to initiate formation of distinct muscle fiber types.

**Key words:** Fibre type, metabolism, mitochondria, transcription factors, calcium, training, acute exercise

Atmung, Herz-Kreislauf, Energiebereitstellung, Stoffwechsellaktivität, Ionentransport, Immunsystem sowie nervale und hormonelle Regelmechanismen. Die schnelle Anpassung erfolgt durch eine Änderung der Aktivität von Enzymen ausgelöst z.B. durch Änderung der Enzymkinetik nach Anstieg oder Abfall von Substrat- bzw. Produktkonzentrationen. Die Aktivität eines Enzyms kann aber auch durch Phosphorylierung beeinflusst werden, was meist durch hormonelle Einflüsse geschieht. Das klassische Beispiel hierzu ist die cAMP-abhängige Regelung des Abbaus von Glykogen. Akut können die Mengen aktiver Enzyme auch durch Kompartimentierung verändert werden, also durch Verschieben von Proteinmolekülen z.B. zwischen Zytosol und Plasmamembran oder Bindung an bzw. Freisetzung von Bindungsproteinen. Letzteres stellt auch einen Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmechanismus dar.

Längerfristige Anpassung erfolgt mit dem Ziel der anhaltenden Änderung der Funktion. Sie erfolgt auf Strukturebene, also durch Genexpression, um den ent- oder untrainierten Muskel leistungsfähig zu machen, die Leistungsfähigkeit des trainierten Muskels noch weiter zu erhöhen, oder den Fasertypus der Muskulatur zu verändern, wenn man z.B. vom Schnellkraft-betonten Sport zum Ausdauersport wechselt. Dadurch werden Mengen und Art (z.B. Isoformen) von Proteinen an den neuen Bedarf angepasst. Auch das Wachstum der einzelnen Zelle (Hypertrophie) bzw. die Zahl von Muskelzellen in einem Faserbündel (Hyperplasie) wird beeinflusst. Letzteres ist nicht gesichert (15). Die Änderung im Expressionsmuster wird durch verschiedene Signale induziert. Basis für die Anpassung auf Ebene der Genexpression ist ein genetisch vorgegebenes Expressionsmuster. Über die letzten Jahre erhöht sich die Zahl der Gene exponentiell, welche mit verschiedenen Formen der Leistungsfähigkeit in Zusammenhang gebracht werden. Diese werden regelmäßig in „updates“ zusammengefasst (26). Diese Gene sind auf praktisch alle Chromosomen im Zellkern sowie auf das mitochondriale Genom verteilt und kodieren für eine Fülle von Proteinen wie z.B. Hormone bzw. hormonbildende Enzyme, Membranrezeptoren für Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme für verschiedenste Stoffwechselwege, und für Proteine des Zytoskeletts, der Zell-Zell-Kontakte und für kontraktile Filamente (26). Allerdings ist unbekannt, ob und wie die Anpassung an Belastung und Training vom ursprünglichen Gen-Muster abhängt.

In dieser Arbeit wird nur auf die Expression von Genen eingegangen, welche durch akute Belastung bzw. Training induziert wird, wobei wiederum nur der kleine Bereich der Anpassung der Genexpression der Muskulatur behandelt wird. Das Hauptgewicht liegt auf der Signaltransduktion zur Steuerung der Genexpression und auf methodischen Aspekten zur Erfassung der Aktivität der Genexpression.

Die Signale, welche die Muskelkontraktion auslösen, generieren in der Muskelzelle auch die Signale zur Steuerung

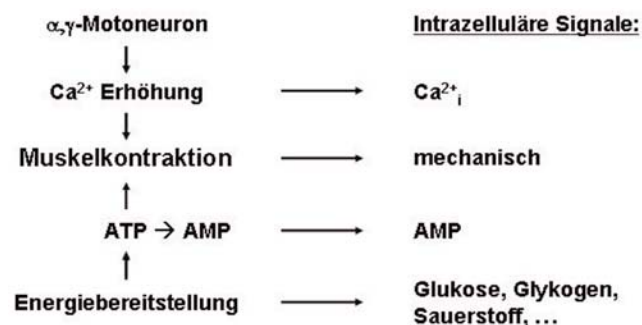


Abbildung 1: Intrazelluläre Signale. Schematische Darstellung der wichtigsten extra- und intrazellulären Reize während einer Muskelkontraktion und die dadurch ausgelösten intrazellulären Signale, welche dann die Zellfunktion und die Genexpression steuern

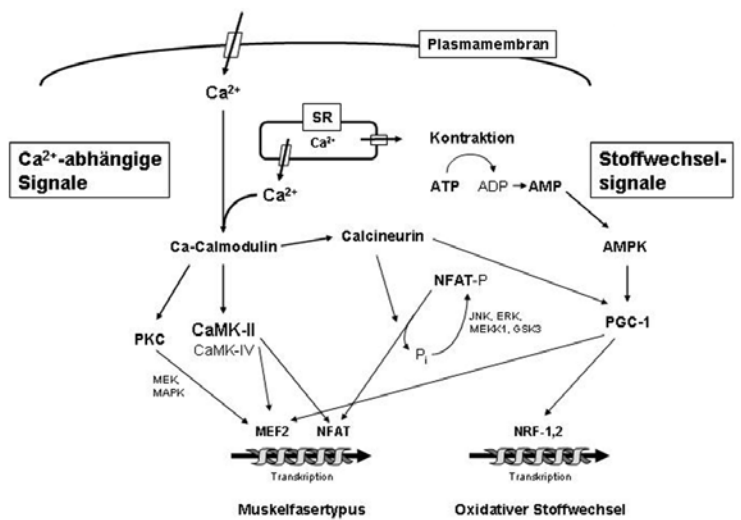


Abbildung 2: Ca<sup>2+</sup> und AMP-abhängige Steuerung der Genexpression in der Muskelzelle. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca Konzentration (Ca<sup>2+</sup>) und ein Anstieg des AMP aktivieren Proteininasen und die Expression von Transkriptionsfaktoren zur Ausbildung eines bestimmten Muskelfasertypus und zur Anpassung der oxidativen Kapazität. Die wichtigsten Systeme im Muskel sind Protein Kinase C, Ca-Calmodulin Kinasen, NFAT, AMPK, und PGC-1 (nach Chin (2)).

ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, AMPK = AMP-abhängige Kinase, ATP = Adenosintriphosphat, CaMK = Ca-Calmodulin-abhängige Kinasen, ERK = extracellular signal-regulated protein kinase, GSK3 = glykogen Kinase Kinase 3, HDAC = Histone-Deacetylase, JNK = c-jun amino terminal protein kinase, MAPK = mitogen activated kinase, MEF2 = myocyte enhancing factor 2, MEK = MAPK kinase, MEKK1 = MEK kinase, NFAT = nuclear factor of activated T-cells, NFAT-P = phosphoryliertes NFAT, NRF-1,2 = nuclear respiratory factor 1 und 2, PGC-1 = peroxysome-proliferator-activated receptor-g co-activator 1, PKC = Protein kinase C (Ca-abhängig), SR = sarkoplasmatisches Retikulum

der Genexpression. Die wichtigsten sind (Abb. 1) die Erhöhung des intrazellulären Ca, mechanische Reize durch die Kontraktion selbst, und die Änderung des Zellstoffwechsels (Spaltprodukte des ATP, Glukose, Glykogen, Sauerstoff, Sauerstoffradikale).

## Signaltransduktion durch Ca<sup>2+</sup>

Eine Aktionspotential an der Plasmamembran der Muskelzelle führt zu einer Freisetzung von Ca aus intrazellulären Speichern und zu einem Ca-Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Somit wird die Ca-Konzentration im Zytosol erhöht, wobei diese Erhöhung pulsatil ist und mit den Kontraktionen einhergeht. Je nach Fasertyp und Erregungsmuster unterscheidet sich die Änderung der Ca-Konzentration bei Belastung. In langsamen Typ-I Muskelfasern steigt die Ca-Konzentration von einem Ruhevwert von ca. 50nM auf Werte zwischen 100 bis 300nM bei einer Erregungsfrequenz von 10 – 30 Hz, während sie in schnellen Typ-II Fasern bei einer Erregungsfrequenz von 80 – 150 HZ Werte von 1 – 3 μM erreichen kann (24).

Ca bindet an das Ca-Bindungsprotein Calmodulin (CaM; Abb. 2) und aktiviert Ca-Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaMK), von denen mehrere Isoformen bekannt sind. Diese Enzyme reagieren spezifisch auf Frequenz, Amplitude und Dauer der Änderung des intrazellulären Ca, können also diese Signale dekodieren (4,3). Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die zytosolische Ca-Konzentration konstant erhöht ist oder sich

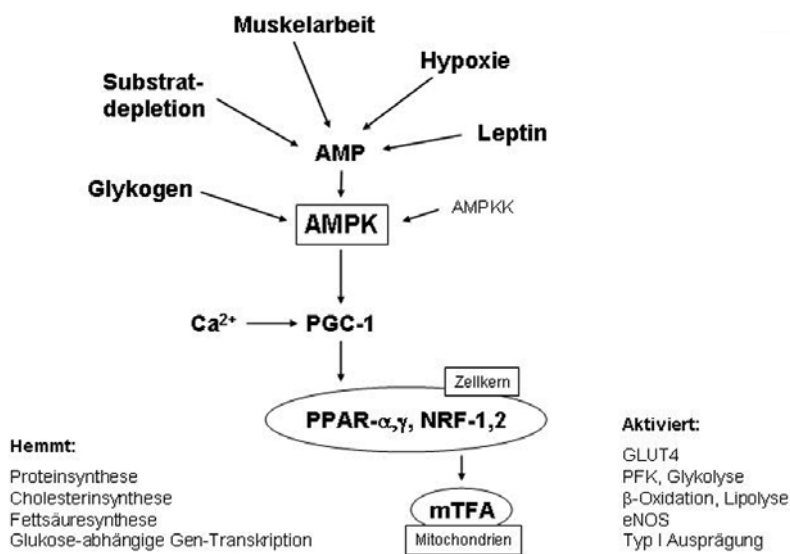


Abbildung 3: Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase (AMPK) -abhängige Signaltransduktion. AMPK wird durch Glykogendepletion, AMPK-Kinasen und AMP stimuliert, wobei ein Anstieg der zellulären AMP Konzentration durch Muskelarbeit, Substratdepletion, Hypoxie, und Leptin verursacht werden kann. AMPK stimuliert PGC-1 (peroxysome-proliferator-activated receptor-co-activator 1; hier besteht eine Verbindung zur Ca-abhängigen Signaltransduktion; Abbildung 2), welches wiederum die Transkriptionsfaktoren PPAR-a,g (peroxysome-proliferator-activated receptor-a,g) und NRF-1,2 (nuclear respiratory factor 1 und 2) und darüber den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (mTFA) und damit die Expression von Enzymen des oxidativen Stoffwechsels stimuliert (nach (2, 6, 10, 12, 22)).

pulsatil verändert. Eine Vielzahl der Untersuchungen dazu wurde an Zellen durchgeführt, in denen die zelluläre Ca-Konzentration mit cAMP erhöht wurde (Übersicht in (2,18)). Die Aktivität der CaMK wird selbst reguliert: So führt Training zu einer vermehrten Expression und Aktivität (3). CaMK steuern dann direkt die Genexpression durch Aktivieren von Transkriptionsfaktoren (3). Einer davon ist MEF (myocyte enhancing factor; verschiedene Typen), welches die Transkription wahrscheinlich Fasertyp-unabhängig stimuliert (3). CaMK-abhängige Reaktionen werden über extrazelluläre Signale, meist Hormone, und durch andere Proteinkinasen (z.B. PKA, PKC, MAPK, ERK) beeinflusst (10,14).

Eine erhöhte zytosolische Ca-Konzentration aktiviert aber auch die Phosphatase Calcineurin (21) (Abb. 2). Dieses dephosphoryliert den im Zytosol befindlichen Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells), welches in den Zellkern gelangt und sich an Gene mit entsprechender Consensus-Sequenz anlagert (22). Auch diese Reaktion wird durch eine Vielzahl von Proteinkinasen (z.B. PKA, PKC, MAPK, ERK) beeinflusst (10,14), so dass die NFAT-abhängige Transkription und die Fasertypisierung durch extra- und intrazelluläre Signale modifiziert werden kann (10). In T-Zellen steigert NFAT nach einer Erhöhung der zellulären Ca-Konzentration die Bildung von IL-6. Im Muskel beeinflusst NFAT über Steigerung der Transkription nur das Wachstum der Muskelzellen und den Typus des Myosins, nicht aber die Anpassung des Zellstoffwechsels. Insgesamt kommt es zur Ausprägung von langsamen Typ I Fasern (21). Dabei wird diskutiert, dass ein Wegfallen des NFAT die Ausbildung schneller Typ II Fasern auslösen könnte.

NFAT-abhängige Genexpression scheint keine Änderung der Expression von Stoffwechsellzymen auszulösen. Deren Expression wird Ca-abhängig über Calcineurin stimuliert. Calcineurin erhöht die Expression des Transkriptionsfaktors PGC-1 (peroxysom-proliferator-activated-receptor co-activator; Übersicht in (2)), einem Co-Faktor für die Bildung weiterer Transkriptionsfaktoren wie PPAR (peroxysome proliferator-activated receptor-a und g) und verschiedener Formen des NRF (nuclear respiratory factor). Letztere stimulieren die Expression von nuklear kodierten Stoffwechsellzymen und des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A (mTFA) im Zellkern (2). mTFA gelangt in die Mitochondrien und stimuliert die Expression von Genen des mitochondrialen Genoms (2), wodurch die Kapazität des aeroben Stoffwechsels erhöht wird. Zusätzlich zur Anpassung des oxidativen Zellstoffwechsels scheint PGC-1 auch in die Ausprägung langsamer Fasern einzugreifen (12).

## Regelung der Genexpression durch Stoffwechselmetabolite

PGC-1 wird nicht nur durch Ca sondern auch durch Stoffwechselmetabolite kontrolliert, vor allem über das Adenosinmonophosphat als Spaltprodukt des ATP (Abb. 3). In dieser Signalkette wird der Transkriptionsfaktor PGC-1 von einer AMP-abhängigen Kinase (AMPK) aktiviert, welche durch eine Abnahme der Konzentration von Energiesubstraten (Glukose, Glykogen), den Anstieg des AMP, und durch andere Stoffwechselmetabolite und verschiedene andere Signale geregelt wird. So bewirkt neben der Belastung selbst (20) auch Glykogendepletion eine AMPK- und PGC-1-abhängige Steigerung der Expression der Pyruvat-Dehydrogenase (19). Dieses Ergebnis ist allerdings nicht ganz eindeutig, da in verschiedenen Muskeln bei vergleichbarer Glykogendepletion nach Belastung unterschiedliche Expressionsmuster von Genen beobachtet wurden (19). AMPK wird auch durch mechanische Belastungsreize (17), durch Hypoxie, und durch Leptin beeinflusst. AMP-abhängige und -unabhängige AMP-Kinase-Kinasen kontrollieren zusätzlich die Aktivität der AMPK durch Phosphorylierung.

## Sauerstoff-abhängige Regelung der Genexpression

Belastung steigert den Sauerstoffverbrauch und führt zu einer Abnahme des  $PO_2$  im Gewebe. Hypoxie verstärkt diesen Effekt. Gewebhypoxie führt durch Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  zur einer Steigerung der Expression Sauer-

stoff-regulierter Gene (23). HIF-1 $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor, welcher konstitutiv exprimiert wird, der bei hohem PO<sub>2</sub> aber sofort abgebaut wird (23). In Hypoxie hingegen wird dieser Abbau gehemmt, so dass die Konzentration von HIF-1 $\alpha$  erhöht ist. HIF-1 $\alpha$  bindet an HIF-1 $\beta$ , welches Sauerstoff-unabhängig exprimiert wird. Beide

## Mechanische Einflüsse auf die Genexpression

Mechanische Signale beeinflussen die Genexpression im Muskel und vielen anderen Geweben wie Fibroblasten, Osteoblasten, und im Knorpel (9). Die mechanische Stimulierung von Muskelzellen aktiviert dabei eine Vielzahl von Signalwegen in einer Zelle (Abb. 4), welche die Anpassung auf der Ebene der Genexpression stimulieren (22). Die zyklische Änderung der Membran-Dehnung bewirkt die Beeinflussung von stretch-aktivierten Kanälen. Zusammen mit der Abnahme des Membranpotentials während des Aktionspotentials kommt es zu einem Ca-Einstrom über spannungsabhängige Ca-Kanäle und somit zu einer Aktivierung der Ca-induzierten Signalkaskade (s. Abb. 2).

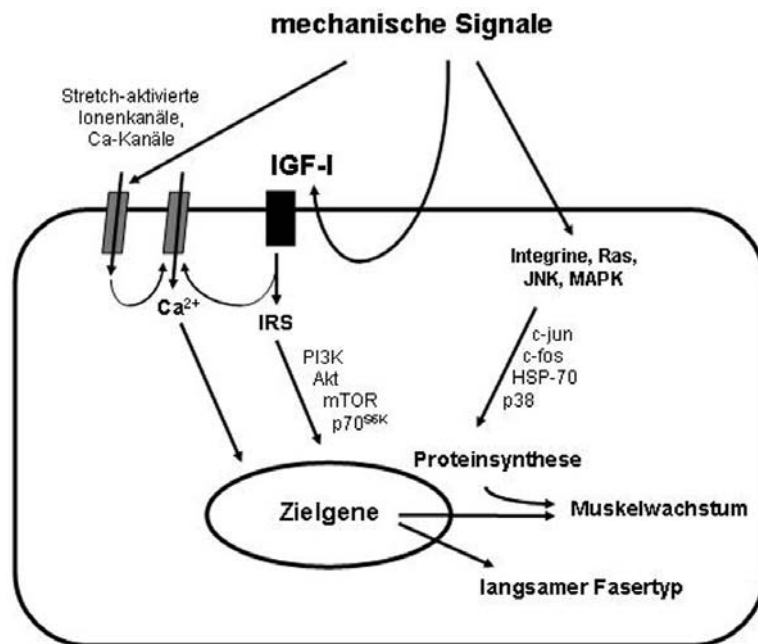


Abbildung 4: Regelung der Genexpression durch mechanische Signale. Mechanische Signale führen durch eine Aktivierung von Ionenkanälen und Freisetzung von IGF-I (insulin-like growth factor-1, MGF) zu einem Anstieg des zellulären Ca und aktivieren so die Ca-abhängige Signaltransduktion (Abbildung 2) und stimulieren IRS (IGF-Rezeptor Substrate) und die Transkription von Zielgenen. Mechanische Signale stimulieren die Proteinsynthese aber auch über Integrine, Ras, JNK, und MAPK und so das Muskelwachstum (nach Tidball (22)). HSP-70 = heat shock protein-70, JNK = c-jun amino terminal protein kinase, MAPK = mitogen activated kinase, mTOR = mammalian target of rapamycin, PI3K = Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase, Ras = kleine G-Proteine

gelangen in den Zellkern und binden an entsprechende DNA-Stellen (hypoxia-response elements), was die Transkription steigert. Unklar ist, ob HIF-1 $\alpha$  auch auf mRNA-Ebene geregelt wird, hierzu sind die Daten widersprüchlich.

Unter dem Einfluss von HIF-1 $\alpha$  werden diejenigen Gene vermehrt transkribiert, welche die Sauerstoffversorgung beeinflussen, z.B. Erythropoetin zur Erhöhung der O<sub>2</sub>-Transportkapazität, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) zur Stimulierung der Kapillarisation, und NO-Synthasen zur Bildung von NO, einem potenten Vasodilatator zur Steigerung der Durchblutung (23). So sind z.B. die VEGF-mRNA im Muskel und der VEGF-Gehalt im venösen Blut während Belastung leicht, vor allem aber in der Erholungsphase deutlich erhöht (11). Zusätzlich wird die Expression von Enzymen stimuliert, welche die anaerobe Energiebereitstellung begünstigen. Dazu gehören Glukosetransporter und Glykolyseenzyme (23). HIF-1 $\alpha$  kontrolliert auch die Expression mancher Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF-I, das nach Belastung auch im Muskel vermehrt vorgefunden wird. Eine Interaktion zwischen IGF-I und HIF-1 $\alpha$  scheint für die Regelung der VEGF-Expression erforderlich zu sein (7).

Die Freisetzung von IGF-I (insulin like growth factor I) und MGF (mechano-growth factor, auch IGF-IEc) wird direkt durch die Muskelkontraktion stimuliert (8). MGF ist dabei eine Splice-Variante des ursprünglich in der Leber gefundenen IGF-I (9). Nach Belastung wird das IGF-Gen transkribiert, wobei zuerst die MGF-Variante gebildet wird, nach etwa einem Tag aber die IGF-I Isoformen gebildet werden; beim Menschen sind dies IGF-IEa und IGF-IEb, die nicht nur im Muskel sondern auch systemisch vorkommen (9). IGF-IEa scheint hauptsächlich unter dem Einfluss des Wachstumshormons gebildet zu werden, welches in Ruhe die Expression des MGF nicht, bei Belastung aber deutlich stimuliert (9).

Da die Bildung des Wachstumshormons im Alter herabgesetzt ist, könnte dieser Mechanismus das im Alter verringerte Muskelwachstum nach Trainingsreizen erklären.

Diese muskulären Wachstumsfaktoren lösen eine Vielzahl von Reaktionen in der Muskelzelle aus (Abb. 4). Zum einen wird durch Aktivierung von Ca-Kanälen wiederum die Ca-Achse aktiviert. Daneben erfolgt die Aktivierung der Genexpression durch MGF aber auch über eine Kaskade von Phosphorylierungsprozessen über Kinasen wie IRS (insulin response substrate), PI3K (Phosphatidyl-Ino-

Tabelle 1: HIF-1 $\alpha$  abhängige Genexpression. Der hypoxie-induzierbare Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von verschiedenen Proteinen stimuliert, die letztlich alle zur besseren Energieversorgung des Gewebes beitragen. HOX = Hämoxygenase, IGF = Insulin-like growth factor, NO = Stickoxid, GLUT = Glukosetransporter, PFK = Phosphofruktokinase, VEGF = vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor

Sauerstofftransport	Glukosestoffwechsel	Zellwachstum
Erythropoetin	GLUT- 1,3,4	Insulin-like growth factors
Transferrin	Glykolyseenzyme	IGF binding protein-1,2,3
Transferrin Rezeptor	PFK-2	
VEGF	Adenylate Kinase-3	
VEGF Rezeptor		
HOX-1		
NO Synthase		
Endothelin-1		

sitol 3-Kinase), Akt (Protein Kinase B), mTOR (mammalian target of rapamycin), und die p70<sup>S6K</sup> Kinase (22). P70<sup>S6K</sup> wird bei Belastung aktiviert und ist ein potenter Stimulus der Proteinsynthese (1).

Mechanische Faktoren stimulieren die Transkriptionsfaktoren c-jun und c-fos innerhalb einer Stunde nach Belastung (6), wobei alle drei Äste des MAP-Kinase Weges (MAPK, Mitogen aktivierte Protein Kinasen) induziert werden, nämlich ERK 1/2, JNK, und p38 (ERK .. extracellular signal related kinase, JNK .. c-jun N-terminal kinase, p38 .. p38 MAP kinase). Dabei kommt es durch eine Modulation von Integrinen, kleinen G-Proteinen, Kinasen und Heat-Shock-Proteinen (z.B. HSP-70) zu einer Steigerung der Genexpression und Translation mit dem Ergebnis des Muskelwachstums, und meist zur Ausprägung des Typ I Phänotypus (6,22).

### Muskuläre Anpassung an Ausdauer- und Krafttraining

Die Komplexität der Steuerung der Genexpression nach Belastung durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli und intrazellulärer, untereinander vernetzter Signalwege sieht man z.B. daraus, dass z.B. die Expression von Myoglobin und Troponin-1 durch PGC-1 nur dann stimuliert werden kann, wenn auch Calcineurin aktiviert ist (12). Dieser (und eine Vielzahl ähnlicher Befunde) impliziert die Frage der Differenzierung der Expressionsmuster z.B. in Abhängigkeit von der Kontraktionsform und der Intensität, also auch nach Unterschieden zwischen verschiedenen Trainingsformen wie Ausdauer- und Krafttraining. Effekte verschiedener Trainings- bzw. Belastungsformen auf die Expression einzelner Gene sind in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben, wobei leider unterschiedliche Trainingsformen zu schwer vergleichbaren Resultaten führen. Möglicherweise können die Effekte dieser Trainingsformen auf die Genexpression auf den Abgleich einiger weniger intrazellulärer Signalwege zurückgeführt werden. So wird die zelluläre Ca-Konzentration bei jeder Art der Kontraktion erhöht, wobei das Muster der Ca-Konzentrationsänderung selbst aber belastungsabhängig ist (24). Die durchschnittliche zelluläre Ca-Konzentration ist aber selbst bei Belastungen niedriger Intensität erhöht (24). Das weist darauf hin, dass die Ca-abhängige Beeinflussung der Genexpression, welche hauptsächlich die Ausprägung des Fasertyps regelt, bei jeder Form von Belastung stimuliert wird. Zu einer signifikanten Depletion von Energiesubstraten, AMP- Akkumulierung und Steigerung der Expression von Enzymen des oxidativen Stoffwechsels kommt es hingegen erst bei intensiver und/oder lange andauernder Belastung. Damit könnte man erklären, warum bei lastfreier oder lastarmer Kontraktion im Muskel bereits die Ausprägung eines Fasertypus stattfindet, während Anpassung auf mitochondriale Ebene Kontraktionen mit Last benötigt (16).

Diese relativ gut definierten Signalwege können jedoch durch unspezifische Signale beeinflusst werden. So werden durch hochintensives Training und Übertraining auch Entzündungsreaktionen aktiviert (möglicherweise über die Bil-

dung von Sauerstoffradikalen), auch stressinduzierte Hormone und Mediatoren steigen stark an. Reaktionen der Zellen auf Stressreaktionen werden über ERK, MEK, MAPK, Heat Shock Proteine und andere Signalkaskaden vermittelt, die auch die belastungsinduzierte Genexpression beeinflussen (Abb. 2, 4)(10). So wurde gezeigt, dass bei Ausdauertraining mit niedriger Intensität HSP70 unverändert bleibt, es bei intensivem Krafttraining jedoch ansteigt (13). Als Anpassungsmechanismus kann gesehen werden, dass jahrelanges Ausdauertraining zu einer „Umprogrammierung“ der Expression regulatorischer Gene mit Änderungen der Signaltransduktion, einem verbesserten Schutz gegen oxidative Schäden und einer erhöhten Stoffwechsellkapazität führt (25).

### Methodische Aspekte

Die oben beschriebenen Untersuchungen zeigen eine Vielfalt von Änderungen der Expression von Proteinen und der

Tabelle 2: Methoden zum Nachweis der muskulären Anpassung an Belastung. Anpassung der Muskulatur und der Leistungsfähigkeit beruht auf Interventionen wie Belastung oder Bettruhe (Enttraining) und dem genetischen Hintergrund (26). Die Belastung führt zur Änderung der Transkription, Translation, zum Umbau verschiedenster Proteine und zur Aktivierung/Inaktivierung von Enzymen. In der rechten Spalte der Tabelle sind einige Methoden zusammengefasst, mit welchen diese Änderungen erfasst werden können. CT = Computertomographie, EMSA = electrophoretic mobility shift assay, MR = Magnetresonanz, PCR = polymerase chain reaction, RT = reverse Transkription, SNP = single nucleotide polymorphism

Stoffwechselweg, Funktion	Methode
Muskelkontraktion, Extra-, intrazelluläre Signale Signaltransduktion	- Intervention (Belastungsreiz) - Hormone im Blut - Muskelbiopsie - Metaboliten in Blut und Muskel - zellphysiologische Untersuchungen
Genmaterial, Genpolymorphismen	- SNPs - PCR - Sequenzierung
Regelung der Transkription	EMSA nuclear run on
Transkription mRNA-Expression RNA-Degradation	- RT-PCR - Northern blots - Microarrays - in situ Hybridisierung
Translation, Proteinsynthese Posttranslationale Modifikation, Translokation	zellphysiologische Methoden
Expression der "fertigen" Proteine	- Western blots - Immunhistochemie - Proteomics
Ergebnis der Intervention, Funktion des modifizierten Systems	- Enzymaktivitätsmessung - Metabolitenkonzentrationen in Blut und Muskel - Histologie - Gewebestruktur (CT, MR) - Phosphorylierung - Belastungstests - Elektromyogramm
Inaktivierung, Abbau	zellphysiologische Methoden

Struktur von Muskeln und Muskelzellen, die z.T. bereits durch einzelne Muskelkontraktionen ausgelöst werden oder aber eine längere Belastungsdauer benötigen. Auch die Belastungsintensität und der Energiestatus vor und während der Belastung spielen eine große Rolle. Daher ist es extrem wichtig, die Intervention und die zu untersuchenden Parameter bzw. Zielgene genau aufeinander abzustimmen. Auch die Probengewinnung und die Probenaufarbeitung müssen optimiert werden. In vielen Fällen sind dann aufwendige Methoden nötig, um ein möglichst komplettes Bild der Abläufe zu erhalten. Ein einzelner Meßparameter erlaubt keine umfassende Aussage.

Man folgt dem typischen Untersuchungsmuster und beginnt mit einer Intervention und Probenentnahmen (Tab. 2), wobei Entnahmeorte, Probenvolumen, und Zeitverlauf nach der Intervention (akute Belastung, Trainingseinheit, längeres Trainingsprogramm) entsprechend gewählt sind und nach einer Probe aus einer Kontrollperiode noch eine Reihe von Proben während und/oder nach der Intervention entnommen und jeweils sofort verarbeitet (z.B. schockgefroren) werden müssen (5). Dabei muss beachtet werden, dass bereits innerhalb eines einzelnen Muskels eine große Heterogenität in Bezug auf neuromuskuläre Aktivität, Fasertyp-Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität bestehen kann.

Tabelle 2 fasst einige wichtige Bestimmungsmethoden zusammen, die eingesetzt werden können, um z.B. DNA/RNA auf Polymorphismen hin zu untersuchen und so den genetischen Hintergrund zu bestimmen. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA in Kernextrakten, die Transkriptionsrate bestimmter Gene und die mRNA Expression weisen auf Stimulierung oder Hemmung der Transkription hin. mRNA kann auch im Gewebeschnitt nachgewiesen werden (in situ Hybridisierung). Microarrays erlauben den Nachweis der Änderung der mRNA vieler Gene gleichzeitig, wobei zu beachten ist, dass hierzu extrem saubere RNA eingesetzt werden muss. Außerdem ist eine Überprüfung der Ergebnisse mittels PCR erforderlich, da die Empfindlichkeit der Chips relativ gering ist. Letzteres impliziert auch die Tatsache, daß man mit dieser Methode kleine Änderungen nicht nachweisen kann, also die Änderung der Expression eventuell relevanter mRNA übersehen kann. Flück und Hoppeler (5) haben hierzu Vorteile und Einschränkungen vieler in der Muskelphysiologie angewandter Methoden aufgezeigt. Verschiedenste zellphysiologische Methoden kann man einsetzen um die posttranslationale Verarbeitung der neu synthetisierten Proteine zu untersuchen. Western blots an Zytosol und/oder Plasmamembranen und immunhistochemische Untersuchungen sind erforderlich, um nachzuweisen, dass die entsprechenden Proteine auch tatsächlich gebildet und in die entsprechenden zellulären Strukturen integriert sind. Dabei sagen diese Ergebnisse noch nichts über die Funktionalität eines Proteins aus. Dies erfordert funktionelle Untersuchungen wie die Messung der Muskelkraft, die Bestimmung von Metaboliten des Zellstoffwechsels und die Messung von Enzymaktivitäten im Gewebe, oder aber die Bestimmung des Funktionszustandes der Proteine durch die Messung des Phosphorylierungsgrades. Erst die Zusammenschau einer

Vielzahl von Parametern erlaubt es, umfassende Aussagen über die zellphysiologische Basis von Änderungen der Muskelfunktion zu erfassen und die entsprechenden Signalkaskaden zu charakterisieren.

## Literatur

1. Baar K, Esser K: Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol* 276 (1999) C120 - C127.
2. Chin ER: The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr Soc* 63 (2004) 279-286.
3. Chin ER: Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol* 99 (2005) 414-423.
4. De Koninck P, Schulman H: Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* 279 (1998) 227-230.
5. Flück M, Dapp C, Schmutz S, Wit E, Hoppeler H: Transcriptional profiling of tissue plasticity: role of shifts in gene expression and technical limitations. *J Appl Physiol* 99 (2005) 397-413.
6. Flück M, Hoppeler H: Molecular basis of skeletal muscle plasticity—from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146 (2003) 159-216. Epub@2003 Jan 14.159-14.216.
7. Fukuda R, Hirota K, Fan F, DoJung Y, Ellis LM, Semenza GL: Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 277 (2002) 38205-38211.
8. Goldspink G: Gene expression in muscle in response to exercise. *J Muscle Res Cell Motil* 24 (2003) 121-126.
9. Goldspink G: Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology (Bethesda)* 20 (2005) 232-238.
10. Hawley JA, Zierath JR: Integration of metabolic and mitogenic signal transduction in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 3 (2004) 24-28.
11. Hiscock N, Fischer CP, Pilegaard H, Pedersen BK: Vascular endothelial growth factor mRNA expression and arteriovenous balance in response to prolonged, submaximal exercise in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285 (2003) H1759-H1763.
12. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM: Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418 (2002) 797-801.
13. Liu Y, Lormes W, Wang L, Reissnecker S, Steinacker JM: Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *Eur J Appl Physiol* 91 (2004) 330-335.
14. Long YC, Widegren U, Zierath JR: Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 63 (2004) 227-232.
15. McCall GE, Byrnes WC, Dickinson A, Pattany PM, Fleck SJ: Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *J Appl Physiol* 81 (1996) 2004-2012.
16. Meissner JD, Gras G, Scheibe RJ, Scholz M, Kubis HP: Calcineurin regulates slow myosin, but not fast myosin or metabolic enzymes, during fast-to-slow transformation in rabbit skeletal muscle cell culture. *J Physiol* 533 (2001) 215-226.
17. Nielsen JN, Mustard KJ, Graham DA, Yu H, MacDonald CS, Pilegaard H, Goodyear LJ, Hardie DG, Richter EA, Wojtaszewski JF: 5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 94 (2003) 631-641.
18. Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Holloszy JO: Raising Ca<sup>2+</sup> in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J* 17 (2003) 675-681.
19. Pilegaard H, Keller C, Steensberg A, Helge JW, Pedersen BK, Saltin B, Neufer PD: Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. *J Physiol* 541 (2002) 261 - 271.
20. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD: Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546 (2003) 851-858.

21. *Schiaffino S, Serrano A*: Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol Sci* 23 (2002) 569-575.
22. *Tidball JG*: Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol* 98 (2005) 1900-1908.
23. *Wenger RH*: Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 16 (2002) 1151-1162.
24. *Westerblad H, Allen DG*: Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *J Gen Physiol* 98 (1991) 615-635.
25. *Wittwer M, Billeter R, Hoppeler H, Flück M*: Regulatory gene expression in skeletal muscle of highly endurance-trained humans. *Acta Physiol Scand* 180 (2004) 217-227.
26. *Wolfarth B, Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rauramaa R, Rivera MA, Roth SM, Rankinen T, Bouchard C*: The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update. *Med Sci Sports Exerc* 37 (2005) 881-903.

**Korrespondenzadresse:**

**Heimo Mairbäurl**  
**Medizinische Klinik VII, Sportmedizin**  
**Universitätsklinikum Heidelberg**  
**Im Neuenheimer Feld 410**  
**69120 Heidelberg**  
**E-mail: heimo.mairbaeurl@med.uni-heidelberg.de**