

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung V, Sportmedizin  
(Schwerpunkt: Leistungsmedizin, spezielle Prävention,  
spezielle Rehabilitation)

**Veränderung des microRNA Profils im Skelettmuskel in  
Antwort auf eine akute Ausdauerbelastung -  
Identifikation möglicher Ansätze für die Entwicklung  
individualisierter Trainingsprogramme**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Grieb, Alexandra Lydia**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. B. Munz

2. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Klingel

Tag der Disputation: 20.04.2023



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	13
1.1 Grundlagen der Trainingsanpassung der Skelettmuskulatur	13
1.1.1 Energiegewinnung und physiologische Trainingsadaptation der Skelettmuskulatur	13
1.1.2 Trainingsadaptation auf molekularer Ebene	19
1.2 Grundlagen der miRNA-Biologie	24
1.2.1 Funktion und Biogenese der miRNAs	24
1.2.2 Skelettmuskelspezifische miRNAs	25
1.2.3 Funktion der miRNAs bei der trainingsinduzierten Adaptation der Skelettmuskulatur	29
Zielsetzung	35
2 Material, Proband*innenkollektiv und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Geräte	37
2.1.2 Verbrauchsmaterial	38
2.1.3 Komplettssets	38
2.1.4 Oligonukleotide	39
2.1.5 Chemikalien	40
2.1.6 Computerprogramme	40
2.2 Ethische Grundlagen	41
2.3 Untersuchtes Proband*innenkollektiv	41
2.3.1 Anthropometrische Daten	41
2.3.2 Körperliche Fitness	42
2.4 Methoden	43
2.4.1 Ermittlung der $\dot{V}O_2\text{max}$	43
2.4.2 Ermittlung der $LT_1$ und $LT_2$	43
2.4.3 Trainingsintervention	44

2.4.4	Probengewinnung	45
2.4.5	RNA-Extraktion	47
2.4.6	Mikroarray-Untersuchung	49
2.4.7	Reverse Transkription	50
2.4.8	Durchführung der qPCR-Experimente	51
2.4.9	Bestimmung der Effizienz der reversen Transkription und der qPCR-Amplifikation	57
2.4.10	Auswertung und Darstellung der qPCR-Ergebnisse	59
2.4.11	Statistische Analyse	61
2.4.12	KEGG-Signalweganalyse	62
3	Ergebnisse	64
3.1	Mikroarray-Analyse	64
3.1.1	Analyse der miRNA-Akutmuster im Kontext einschlägiger Literaturdaten	64
3.1.2	Identifikation stark regulierter miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur	82
3.1.3	Korrelation zwischen der trainingsinduzierten $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der Mikroarray-Analyse	86
3.1.4	KEGG-Signalweganalyse der stark regulierten miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur	92
3.2	qPCR-Analyse	97
3.2.1	Auswahl der zu analysierenden miRNAs	97
3.2.2	Auswahl der Referenz-miRNAs	98
3.2.3	Bestimmung der optimal einzusetzenden cDNA-Menge für die qPCR-Experimente	101
3.2.4	Evaluation der Kongruenz zwischen den qPCR- und Mikroarray-Daten	104
3.2.5	Veränderung der miRNA-Muster bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur in der Gesamtkohorte	113
3.3	Korrelationsanalysen	136
3.3.1	Auswertung der $\dot{V}O_2\text{max}$ -Daten	137
3.3.2	Korrelation zwischen der trainingsinduzierten $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der qPCR-Analyse	139
3.3.3	Auswertung der LTP <sub>2</sub> -Daten	143

3.3.4	Korrelation zwischen der trainingsinduzierten $\Delta\text{LTP}_2$ und den belastungsinduzierten miRNA-Aktmustern der qPCR-Analyse _____	145
3.4	KEGG-Signalweganalyse der korrelierenden miRNAs der qPCR-Untersuchung _____	149
4	Diskussion _____	153
4.1	Diskussion der miRNA-Analyse _____	154
4.1.1	Vergleich der Mikroarray-Ergebnisse mit einschlägigen Literaturdaten _____	154
4.1.2	Funktionelle Rolle der differenziell exprimierten miRNAs _____	159
4.1.3	Potenzial der miRNAs als prognostische molekulare Marker der individuellen Trainingsreaktion _____	162
4.1.4	Limitationen der miRNA-Analyse _____	166
4.2	Diskussion methodischer Aspekte _____	168
4.2.1	Bewertung der Mikroarray-Technik als Screening-Tool _____	168
4.2.2	Bewertung der LNA-qPCR-Technik als Validierungsinstrument _____	171
4.2.3	Bewertung der $\Delta\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ und der $\Delta\text{LTP}_2$ als Marker der aeroben Ausdauerleistung _____	173
5	Zusammenfassung _____	178
6	Literaturverzeichnis _____	180
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	210
8	Danksagung _____	211

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben .....	37
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Artikelnummer (Art. Nr.) und Herstellerangaben .....	38
Tabelle 3 Verwendete Komplettssets mit Art. Nr. und Herstellerangaben.....	38
Tabelle 4: Verwendete PCR- <i>Primer</i> mit Katalognummer (Kat. Nr.) und Herstellerangaben .....	39
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien mit Art. Nr. und Herstellerangaben.....	40
Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme mit Angaben des Urhebers .....	40
Tabelle 7: Übersicht der anthropometrischen Charakteristika der Studienteilnehmerinnen.....	42
Tabelle 8: Übersicht über stark regulierte miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur in der Mikroarray-Analyse. ....	84
Tabelle 9: $\dot{V}O_2$ max-Daten der Probandinnen der Mikroarray-Analyse. ....	86
Tabelle 10 Berechnung des Grenzwertes für den Korrelationskoeffizienten $r$ . .	87
Tabelle 11: Korrelation zwischen der $\Delta\dot{V}O_2$ max T0/T1 und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der Mikroarray-Analyse.....	88
Tabelle 12: KEGG-Signalweganalyse der in der Mikroarray-Analyse induzierten miRNAs. ....	93
Tabelle 13: KEGG-Signalweganalyse der in der Mikroarray-Analyse reprimierten miRNAs. ....	96
Tabelle 14 Stabilität der miRNAs unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen der qPCR-Analyse.....	100
Tabelle 15: Vergleich der Konkordanz der Mikroarray- und der qPCR- Ergebnisse. ....	105
Tabelle 16: <i>Fold changes</i> und p-Werte der qPCR-Analyse.....	116
Tabelle 17: Korrelation zwischen den Veränderungen der belastungsinduzierten Akutmuster verschiedener miRNAs.....	116
Tabelle 18: $\dot{V}O_2$ max-Daten der Probandinnen der qPCR-Analyse.....	138
Tabelle 19: Erbrachte Leistung an der LT <sub>2</sub> der Probandinnen der qPCR- Analyse. ....	144
Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse der qPCR-Korrelationsanalysen. ....	148

Tabelle 21: KEGG-Signalweganalyse der korrelierenden miRNAs der qPCR-Korrelationsanalysen.....	152
Tabelle 22: Vergleich einschlägiger Literaturdaten mit den Mikroarray-Ergebnissen der miRNA-Akutantwort in der Skelettmuskulatur.....	158



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Energiegewinnung in der Skelettmuskulatur unter körperlicher Belastung. ....	14
Abbildung 2: Laktatkurve in Abhängigkeit der Trainingsleistung und des Trainingsstatus. ....	16
Abbildung 3: Molekulare Mechanismen der trainingsinduzierten Adaptation. ..	23
Abbildung 4: Funktion der muskelspezifischen miRNAs. ....	28
Abbildung 5: MiRNA-Regulation in der Skelettmuskulatur in Reaktion auf Krafttraining. ....	31
Abbildung 6: MiRNA-Regulation in der Skelettmuskulatur in Reaktion auf Ausdauertraining. ....	34
Abbildung 7: Laktatschwellenkonzept und Übersicht über die einzelnen Trainingsprogramme. ....	45
Abbildung 8: Zeitplan und Studiendesign der iReAct-Studie. ....	47
Abbildung 9: Phasen einer qPCR-Amplifikationskurve. ....	54
Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse. ....	55
Abbildung 11: Vergleich der Struktur eines LNA-, eines RNA- und eines DNA-Nukleotids. ....	56
Abbildung 12: Amplifikationskurve des UniSp6 RNA-Transkripts. ....	59
Abbildung 13: Mikroarray-Daten der muskelspezifischen miRNAs. ....	69
Abbildung 14: Mikroarray-Daten für miR-23a und miR-378a. ....	72
Abbildung 15: Mikroarray-Daten für miR-21, miR-107, miR-128-3p und miR-181a. ....	75
Abbildung 16: Mikroarray-Daten für miR-9 und miR-31. ....	78
Abbildung 17: Mikroarray-Daten für miR-10a-5p, miR-27a-3p, miR-126-3p und miR-152-3p. ....	81
Abbildung 18 : Übersicht der induzierten und reprimierten miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur in der Mikroarray-Analyse. ....	85
Abbildung 19: Korrelation zwischen der $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der Mikroarray-Analyse. ....	91

Abbildung 20: Stabilität der analysierten miRNAs unter den gegebenen qPCR-Bedingungen gemäß dem Programm RefFinder.....	101
Abbildung 21: Verdünnungsreihe von miR-1-3p und miR-378a-5p. ....	103
Abbildung 22: Konkordanz zwischen den Mikroarray- und den qPCR-Daten. ....	113
Abbildung 23: Veränderung von miR-1-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	118
Abbildung 24 Veränderung von miR-133a-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	119
Abbildung 25 Veränderung von miR-133a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	120
Abbildung 26 Veränderung von miR-133b bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	121
Abbildung 27 Veränderung von miR-499a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	122
Abbildung 28: Veränderung von miR-27a-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	123
Abbildung 29: Veränderung von miR-378a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	124
Abbildung 30: Veränderung von miR-497-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	125
Abbildung 31 Veränderung von miR-199a-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	126
Abbildung 32: Veränderung von miR-199a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	127
Abbildung 33: Veränderung von miR-15a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	128
Abbildung 34: Veränderung von miR-18a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	129
Abbildung 35: Veränderung von miR-19b-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	130
Abbildung 36: Veränderung von miR-132-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	131

Abbildung 37: Veränderung von miR-155-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.....	132
Abbildung 38: Mikroarray-Daten für miR-23a-5p, miR-4330, miR-4743-5p und miR-7151-3p.....	134
Abbildung 39: Amplifikations- und Schmelzkurvenanalyse von miR-23a-5p, miR-4330, miR-4743-5p und miR-7151-3p. ....	135
Abbildung 40: Korrelation zwischen der $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der Skelettmuskulatur. ....	142
Abbildung 41: Korrelation zwischen der $\Delta\text{LTP}_2$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der Skelettmuskulatur. ....	147

## Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA .....	<i>Acetyl-Koenzym A</i>
AKT .....	<i>Proteinkinase B</i>
AMP .....	<i>Adenosinmonophosphat</i>
AMPK .....	<i>AMP-aktivierte Kinase</i>
Art. Nr. ....	<i>Artikelnummer</i>
ATP .....	<i>Adenosintriphosphat</i>
BMI .....	<i>Body-Maß-Index</i>
bpm .....	<i>beats per minute</i>
CaMKII .....	<i>Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II</i>
cDNA .....	<i>komplementäre DNA</i>
Ct .....	<i>Zyklusschwellenwert</i>
DNA .....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dsDNA .....	<i>doppelsträngige DNA</i>
ECM .....	<i>Extrazellulärmatrix</i>
FOXO .....	<i>Forkhead-Box-Protein O</i>
GC .....	<i>Guanin-Cytosin</i>
HF <sub>max</sub> .....	<i>maximale Herzfrequenz</i>
HIIT .....	<i>hochintensives Intervalltraining</i>
IGF-1 .....	<i>insuline-like growth factor</i>
IR .....	<i>pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer</i>
iReAct .....	<i>individual response to physical activity</i>
Kat. Nr .....	<i>Katalognummer</i>
KEGG .....	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LNA .....	<i>locked nucleid acid</i>
LT <sub>1</sub> .....	<i>erste Laktatschwelle</i>
LT <sub>2</sub> .....	<i>zweite Laktatschwelle</i>
LTP <sub>1</sub> .....	<i>erbrachte Leistung an der ersten Laktatschwelle</i>
LTP <sub>2</sub> .....	<i>erbrachte Leistung an der zweiten Laktatschwelle</i>
MICT .....	<i>moderat-intensives kontinuierliches Training</i>

miRNA.....	<i>microRNA</i>
MRF .....	<i>Muskel-regulierender Transkriptionsfaktor</i>
mTORC1 .....	<i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
MW.....	<i>Mittelwert</i>
MYOD .....	<i>myogener Faktor 3</i>
myomiR .....	<i>muskelspezifische microRNA</i>
NADH .....	<i>Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid</i>
NRF1/2.....	<i>nuclear respiratory factor 1/2</i>
p38MAPK .....	<i>p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i>
p70S6K .....	<i>ribosomale Protein-S6-Kinase</i>
PGC .....	<i>Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-<math>\gamma</math>-Koaktivator</i>
PI3K .....	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PTEN.....	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RER.....	<i>respiratorische Austauschrate</i>
RISC.....	<i>RNA-induzierter Silencing-Komplex</i>
RNA.....	<i>Ribonukleinsäure</i>
ROS .....	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
SD .....	<i>Standardabweichung</i>
SIRT1 .....	<i>Sirtuin 1</i>
SRF .....	<i>serum response factor</i>
TAC.....	<i>Transcriptom Analysis Console</i>
TFAM .....	<i>mitochondrialer Transkriptionsfaktor A</i>
TGF .....	<i>transforming growth factor</i>
TSC1/2 .....	<i>Tuberöser-Sklerose-Komplex 1/2</i>
UTR.....	<i>untranslatierte Region</i>
VEGF .....	<i>vascular endothelial growth factor</i>
$\dot{V}O_2$ .....	<i>Sauerstoffaufnahme</i>
$\dot{V}O_{2max}$ .....	<i>maximale Sauerstoffaufnahme</i>
YAP .....	<i>Yes-assoziiertes Protein</i>
$\Delta LTP_2$ .....	<i>Veränderung der erbrachten Leistung an der zweiten Laktatschwelle</i>
$\Delta \dot{V}O_{2max}$ .....	<i>Veränderung der maximalen Sauerstoffaufnahme</i>

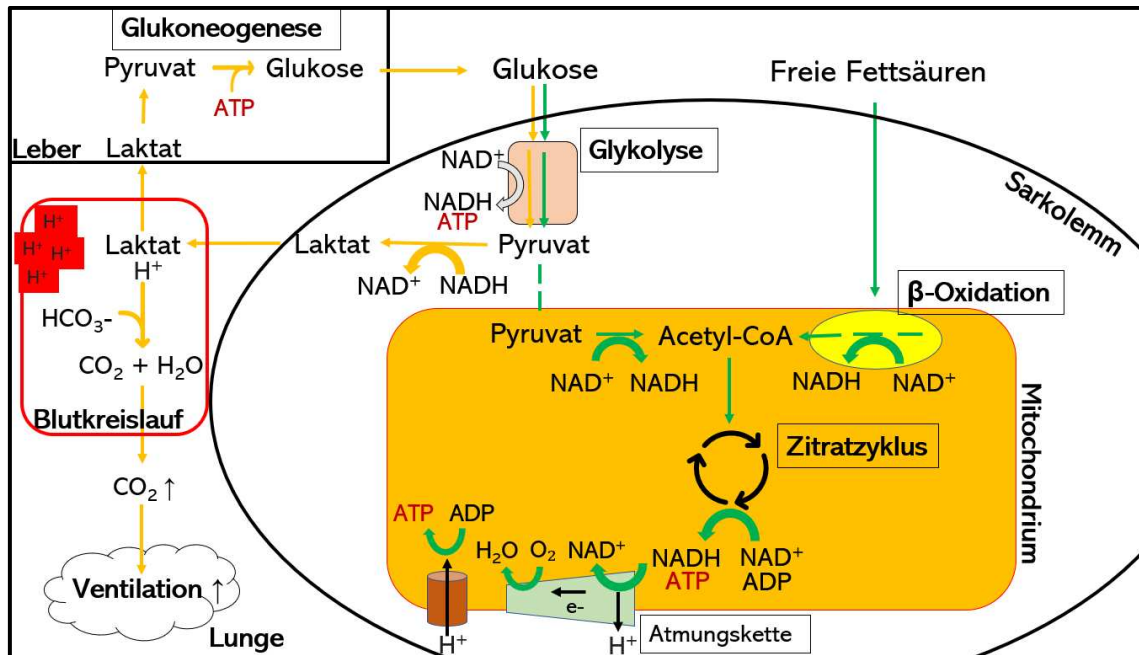
# 1. Einleitung

## 1.1 Grundlagen der Trainingsanpassung der Skelettmuskulatur

### 1.1.1 *Energiegewinnung und physiologische Trainingsadaptation der Skelettmuskulatur*

Die Ausdauerfähigkeit der Skelettmuskulatur wird in hohem Maße durch die Energiebereitstellung determiniert. Das Verständnis der hierbei ablaufenden biochemischen Prozesse ist also essenziell, um die physiologischen Anpassungen in Reaktion auf Training zu verstehen (Egan & Zierath, 2013). Die Energiegewinnung wird durch eine Vielzahl an Faktoren, einschließlich der Art des Trainings sowie der Häufigkeit, Intensität und Dauer der Trainingseinheiten bestimmt. Bei niedriger bis mittlerer Trainingsintensität greift der Skelettmuskel primär auf Glukose sowie freie Fettsäuren, die durch Lipolyse im Fettgewebe freigesetzt werden, zurück (Hargreaves & Spriet, 2020). Die freien Fettsäuren werden in den Mitochondrien über die  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-Koenzym A (Acetyl-CoA) abgebaut, welches in den Zitratzyklus eingeschleust wird (Hargreaves & Spriet, 2020; Horowitz, 2003). Das in der Glykolyse gebildete Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen ebenfalls zu Acetyl-CoA verstoffwechselt und dem Zitratzyklus zugeführt. Das anfallende Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) wird durch die NADH-Dehydrogenase oxidiert und die Elektronen auf Sauerstoff zur Generierung von Adenosintriphosphat (ATP) mittels oxidativer Phosphorylierung übertragen (Hargreaves & Spriet, 2020) (s. Abbildung 1). In diesem Trainingsbereich steigt die Sauerstoffaufnahme ( $\dot{V}O_2$ ) linear an und auf Grund der überwiegend aeroben Energiegewinnung kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der Blutlaktatkonzentration (Binder et al., 2008).

Mit zunehmender Trainingsintensität nimmt die Verwertung der freien Fettsäuren ab, wohingegen die Glukoseverbrennung progressiv zunimmt. Der Körper gewinnt die benötigte Energie vermehrt durch anaerobe Glykolyse, da nicht genügend Sauerstoffmoleküle als Elektronenakzeptoren für die NADH-Regeneration zur Verfügung stehen. Das anfallende Pyruvat wird vermehrt in Laktat (und  $NAD^+$ ) umgewandelt (Hargreaves & Spriet, 2020) (s. Abbildung 1).

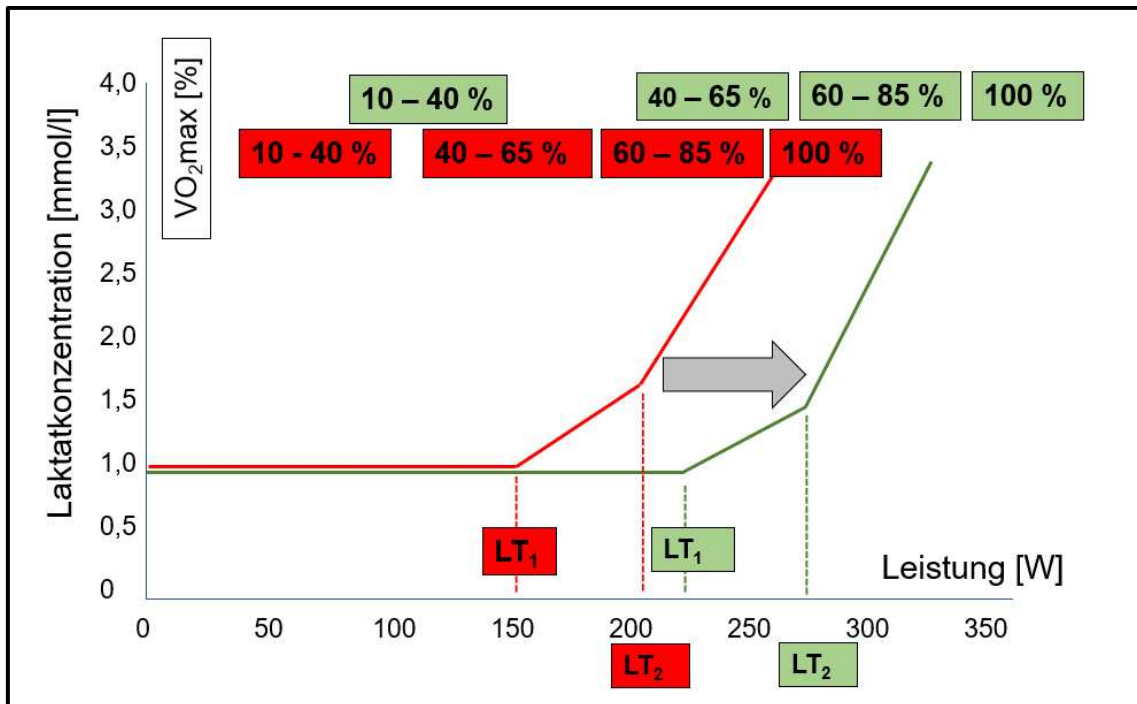


**Abbildung 1: Energiegewinnung in der Skelettmuskulatur unter körperlicher Belastung.** Bei niedrigen Trainingsintensitäten (grün markierte Pfeile) wird die Energie durch  $\beta$ -Oxidation der freien Fettsäuren in Acetyl-CoA sowie Verstoffwechslung von Glukose gewonnen. Das in der Glykolyse anfallende Pyruvat wird unter diesen Bedingungen überwiegend in Acetyl-CoA umgewandelt, welches in den Zitratzyklus zur Bildung von ATP und NADH eingeschleust wird. Das NADH wird über die Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran (= Atmungskette) unter Bildung von H<sub>2</sub>O regeneriert. Der entstehende Protonengradient wird für die Bildung von ATP genutzt. Bei steigenden Trainingsintensitäten (orange markierte Pfeile) stehen nicht mehr ausreichend Sauerstoffmoleküle für die Energiegewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung zur Verfügung. Die Energie wird vermehrt durch anaerobe Glykolyse gewonnen, wobei das anfallende Pyruvat hauptsächlich zu Laktat verstoffwechselt wird. Übersteigt die Laktatproduktion die Stoffwechselkapazität der Muskulatur, tritt vermehrt Laktat in den Blutkreislauf über und wird über die Leber unter Verbrauch von ATP regeneriert (= Glukoneogenese). Steigt die Laktatproduktion weiter an, übersteigt sie an einem bestimmten Punkt die Abbaukapazität des Organismus und Laktat akkumuliert (rot markierte H<sup>+</sup>). Acetyl-CoA: Acetyl-Koenzym A; NADH/NAD<sup>+</sup>: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Übersteigt die Laktatproduktion die Stoffwechselkapazität in der Muskelzelle, tritt das Laktat in den Blutkreislauf über. Dieser erste detektierbare Anstieg der Laktatkonzentration markiert die erste Laktatschwelle (LT<sub>1</sub>) (Kindermann, 2004) (s. Abbildung 2). Ab diesem Zeitpunkt nimmt die anaerobe Energiegewinnung mit steigender Leistungsintensität zu, daher wird dieser Schwellenwert auch als aerobe Schwelle bezeichnet (Kindermann, 2004). Die oxidative Kapazität des Gesamtorganismus ist jedoch ausreichend hoch die anfallenden Protonen über Bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) abzuf puffern, und das entstehende CO<sub>2</sub> führt zu einer

überproportionalen Steigerung der Ventilation (Binder et al., 2008; Poole et al., 2021) (s. Abbildung 1). Die höchste Dauerbelastung, die über einen längeren Zeitraum ohne einen systematischen Anstieg der Blutlaktatkonzentration (Anstieg um weniger als 1 mmol/l) durchgeführt werden kann, wird als "maximales Laktat-*Steady-State*" (Heck, 1990) bezeichnet und markiert die zweite Laktatschwelle ( $LT_2$ ) (s. Abbildung 2). Auf Grund der ab dieser Leistungsintensität überwiegend anaeroben Energiegewinnung wird diese Grenze auch als individuelle anaerobe Schwelle bezeichnet (Stegmann et al., 1981). Bei einer weiteren Steigerung der Belastung über die  $LT_2$  hinaus übersteigt die muskuläre Laktatproduktionsrate die systemische Eliminationsrate, obwohl es zu einem zweiten überproportionalen Anstieg der Ventilation kommt. Es resultiert ein exponentieller Anstieg der Blutlaktatkonzentration trotz konstanter Belastung (Skinner & McLellan, 1980). Die  $LT_2$  stellt somit einen physiologischen Grenzwert für die höchste Arbeitsbelastung dar, die über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden kann und wird daher als „metabolische Ausdauerleistungsgrenze“ bezeichnet (Berg, 1993). Generell gilt, dass die Ausdauerleistungsfähigkeit umso höher ist, je höher die erbrachte Leistung im Verhältnis zur Blutlaktatkonzentration ist (Roecker, 2013) (s. Abbildung 2).





**Abbildung 2: Laktatkurve in Abhängigkeit der Trainingsleistung und des Trainingsstatus.** Dargestellt ist die Blutlaktatkonzentration [mmol/l] auf der y-Achse in Abhängigkeit der erbrachten Leistung [W] auf der x-Achse. Rot markiert die Laktatkurve sowie die dazugehörigen Angaben einer untrainierten Person. Grün markiert die Laktatkurve sowie die dazugehörigen Angaben einer trainierten Person. Die prozentualen  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Werte je Leistungsintensität sind über den Laktatkurven angegeben. Durch die trainingsinduzierte Zunahme der  $\dot{V}O_2\text{max}$  verschiebt sich die Kurve nach rechts (grauer Pfeil), da auf Grund des größeren Sauerstoffangebots mehr Energie über die oxidative Phosphorylierung gewonnen werden kann. Daher kommt es erst bei einer höheren Leistung zu einem Anstieg der Laktatkonzentration. Der erste detektierbare Anstieg der Laktatkonzentration markiert die  $LT_1$ , die bei einer Leistungsintensität, die ca. 40 – 65 % der  $\dot{V}O_2\text{max}$  entspricht, erreicht wird. Steigt die Belastungsintensität weiter an, übersteigt das anfallende Laktat die Stoffwechselleistung des Organismus und es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Blutlaktatkonzentration. Dieser zweite Anstieg markiert die  $LT_2$ , welche im Bereich der Leistungsintensität liegt, die ca. 60 – 85 % der  $\dot{V}O_2\text{max}$  entspricht.  $LT_1$ : erste Laktatschwelle;  $LT_2$ : zweite Laktatschwelle;  $\dot{V}O_2\text{max}$ : maximale Sauerstoffaufnahme. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Die Kapazität der Skelettmuskulatur Energie mittels oxidativer Phosphorylierung zu gewinnen kann indirekt über den respiratorischen Quotienten (RQ) auf zellulärer Ebene oder die respiratorische Austauschrate (RER), die mittels Spiroergometrie erfasst wird, bestimmt werden. Diese zeigen den relativen Beitrag von Kohlenhydraten und Lipiden zum Gesamtenergieverbrauch an und errechnen sich aus dem Quotienten aus  $CO_2$ -Abgabe und  $\dot{V}O_2$  (Nelson et al., 2015). Der physiologische Bereich der RER liegt zwischen 0,7 und 1,2, wobei

eine niedrige RER auf eine vorwiegend oxidative Energiegewinnung aus freien Fettsäuren hindeutet, wohingegen eine hohe RER die überwiegende Verwertung von Kohlenhydraten widerspiegelt (Pendergast et al., 2000; Simonson & DeFronzo, 1990). Mit steigender Trainingsintensität nimmt die Utilisation von Kohlenhydraten progressiv zu, wodurch die CO<sub>2</sub>-Produktion, und folglich auch die RER, ansteigt. Eine RER > 1 wird mit der Aktivierung des anaeroben Stoffwechsels und einer trainingsinduzierten metabolischen Azidose in Verbindung gebracht (Wasserman et al., 1973). Daher wurde eine RER von  $\geq 1,00$ ,  $\geq 1,10$  oder  $\geq 1,15$  als Kriterium für das Erreichen der maximalen Ausbelastung genannt (Aspenes et al., 2011; B. Issekutz et al., 1962; Brown et al., 2002; Davis et al., 2002; Howley et al., 1995; Nelson et al., 2010; Paterson et al., 1999; Wasserman et al., 1987). Jedoch können mehrere Faktoren den Energiestoffwechsel und damit die RER während des Trainings beeinflussen, einschließlich die Menge an Muskelglykogen, die Konzentration freier Fettsäuren im Plasma und der prozentuale Anteil von Fetten und Kohlenhydraten in der Nahrung (Goedecke et al., 2000). Auf Grund der Vielzahl an Einflussfaktoren spielt die RER daher in der Trainingsdiagnostik heutzutage eine untergeordnete Rolle.

In engem Zusammenhang mit der RER steht die maximale Sauerstoffaufnahme ( $\dot{V}O_2\text{max}$ ), definiert als die höchste Rate an Sauerstoff, die der Körper bei schwerer Belastung aufnehmen und verwerten kann (Bassett, 2000). Sie ist eine der einflussreichsten Variablen, die die Kapazität der Skelettmuskulatur begrenzt Energie mittels oxidativer Phosphorylierung zu gewinnen, und stellt daher zusammen mit der LT<sub>2</sub> einen der wichtigsten determinierenden Faktoren für die individuelle aerobe Ausdauerleistung dar (Bassett, 2000). In Ruhe beträgt die  $\dot{V}O_2\text{max}$  durchschnittlich 3,5 ml/kg×min. Durch körperliche Belastung kann sie um das 10 - 15fache des Ruhewertes ansteigen, bei Spitzensportlern können Werte von über 85 ml/kg×min gemessen werden (Saltin & Astrand, 1967). Diese trainingsinduzierte Zunahme der  $\dot{V}O_2\text{max}$  wird primär durch eine Steigerung des kardialen Schlagvolumens und einhergehender Steigerung des Herzzeitvolumens sowie sekundär durch die Zunahme der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz und den Veränderungen der Gefäßarchitektur hervorgerufen,

welche durch eine Zunahme der Arteriolen- und Kapillardichte gekennzeichnet sind (Bassett, 2000; Hellsten & Nyberg, 2015). Darüber hinaus wurde in Athleten eine erhöhte vasodilatatorische Reserve im Vergleich zu untrainierten Personen beschrieben, die mit wiederholten mechanischen Reizen sowie hämodynamischen und humoralen Stimuli in Verbindung gebracht wird (Martin et al., 1987; Snell et al., 1987). Jedoch sind die Mechanismen, die diese erhöhte vasodilatatorische Reaktion bestimmen, noch nicht abschließend verstanden. Die durch diese Prozesse ausgelöste Hyperämie der Skelettmuskulatur resultiert in einem linearen Anstieg des Blutflusses zu der aktivierten Muskulatur mit steigender Trainingsintensität und somit zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung der arbeitenden Muskulatur (Andersen & Saltin, 1985; Green et al., 2012; Hellsten et al., 2012; Hoier & Hellsten, 2014).

Neben den genannten kardiovaskulären Faktoren stellt die oxidative Kapazität der Mitochondrien eine wichtige Determinante der Ausdauerleistung dar (Hawley, 2002). Ausdauertraining führt zu einer Zunahme der mitochondrialen Dichte und Funktion (mitochondriale Biogenese), wodurch die Bereitstellung und Nutzung energieliefernder Substrate im arbeitenden Muskel verbessert wird (Phillips et al., 1996; Vollaard et al., 2009). Durch die erhöhte Anzahl von Proteinen, die an der mitochondrialen ATP-Produktion (Holloszy, 1967), dem Zitratzyklus (Egan et al., 2011), der Mobilisierung, dem Transport und der Oxidation von Fettsäuren (Talanian et al., 2010; Tremblay et al., 1994) sowie der Sauerstoffzufuhr und -extraktion (Egan et al., 2011; Gavin et al., 2007) beteiligt sind, kommt es erst bei einer höheren Leistungsintensität zu einer Laktatakkumulation und somit zu einer gesteigerten metabolischen Ausdauerleistungsfähigkeit (Gollnick & Saltin, 1982). Dies wird durch einen Anstieg der erbrachten Leistung an der LT<sub>2</sub> veranschaulicht (s. Abbildung 2).

Darüber hinaus führt die Konversion von Muskelfasern vom Typ II in Muskelfasern vom Typ I zu einer Steigerung der oxidativen Kapazität. Myofasern vom Typ I weisen eine hohe Mitochondriendichte und daher ein hohes oxidatives Potenzial auf. Sie sind durch eine langsame Kontraktionszeit und eine hohe Ermüdungsresistenz gekennzeichnet (Bassel-Duby & Olson, 2006; Saltin et al., 1977). Fasern vom Typ II erzeugen auf Grund des niedrigeren

Mitochondriengehalts mehr ATP aus glykolytischen Stoffwechselwegen. Sie weisen eine schnellere Kontraktionszeit auf, aber auch ein schnelleres Ermüdungsprofil (Bassel-Duby & Olson, 2006; Saltin et al., 1977).

Da die Leistungsfähigkeit somit primär von der  $\dot{V}O_2\text{max}$  und der Geschwindigkeit der Laktatakkumulation abhängt, werden Trainingsintensitäten üblicherweise als Prozentsätze der  $\dot{V}O_2\text{max}$  oder der erbrachten Leistung an den Laktatschwellen angegeben. Da die  $\dot{V}O_2\text{max}$  maßgeblich durch das kardiorespiratorische System begrenzt ist (Beck et al., 2006), wird die Intensität darüber hinaus auch anhand der altersabhängigen geschätzten maximalen Herzfrequenz ( $HF_{\text{max}}$ ) (=  $220 - \text{Lebensalter}$ ) definiert (Meyer et al., 1999). Die  $LT_2$  wird, in Abhängigkeit von Sportart und Fitnessniveau der Person, bei einer Leistungsintensität, die ca. 60 % bis 85 % der  $\dot{V}O_2\text{max}$  entspricht, erreicht (die  $LT_1$  bei ca. 40 % bis 65 % der  $\dot{V}O_2\text{max}$ ) (Kindermann, 2004; Schwarz et al., 2002) (s. Abbildung 2).

### **1.1.2 Trainingsadaptation auf molekularer Ebene**

Die beschriebenen Veränderungen sind das Resultat wiederholter Modulation von Signalwegen und damit einhergehender veränderter transkriptioneller Aktivität. Durch kumulative Effekte, induziert durch wiederholte Trainingseinheiten, kommt es mit der Zeit zur Anhäufung oder Verminderung der Menge spezifischer Proteine und somit zu einem veränderten Muskelphänotyp (Egan et al., 2013; Flück & Hoppeler, 2003; Perry et al., 2010). Diese vielschichtigen Umgestaltungsprozesse werden hierbei durch Trainingsvolumen, -intensität und -frequenz sowie der Art und Dauer des einzelnen Trainingsstimulus bestimmt (Hawley, 2002). Aerobes (oder Ausdauertraining) und Krafttraining stellen hierbei zwei Extreme des Übungskontinuums dar, nicht nur im Hinblick auf die ausgeübten Reize, sondern auch in Bezug auf die Aktivierung unterschiedlicher molekularer Signalwege und Gennetzwerke, welche zu unterschiedlichen Modus-spezifischen Anpassungen an chronisches Training führen (Atherton et al., 2005; Coffey & Hawley, 2007; Hawley, 2009).

#### 1.1.2.1 Gen- und Signalwegmodulation in Antwort auf Krafttraining

Die spezifischen Anpassungen in Reaktion auf Krafttraining umfassen primär die Erhöhung der Proteinsynthese, sowie die Rekrutierung zusätzlicher Muskelzellen

zur Bildung neuer kontraktile Filamente (Bolster et al., 2003; Rennie et al., 2004). Zusätzlich werden Atrophie-induzierende Signalwege inhibiert, sodass das Muskelwachstum gefördert wird (Jones et al., 2004). Eine Schlüsselrolle in der trainingsinduzierten Hypertrophie wird der Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K-) AKT-Signalkaskade zugeschrieben (Mendez et al., 1997). Dieser Signalweg wird durch muskuläre Kontraktion *per se*, aber auch durch hohe Konzentrationen der anabolen Hormone insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und Somatotropin (= Wachstumshormon) aktiviert (Bamman et al., 2001; Hymer et al., 2001; Kraemer et al., 1990; Nindl, 2007; Nindl et al., 2003). Die gesteigerte Aktivität von AKT, häufig auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet, führt zur Phosphorylierung des mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) und somit zu dessen Aktivierung. Hierdurch wird eine gesteigerte Proteinsynthese durch die Induktion der ribosomalen Protein-S6-Kinase (p70S6K) sowie durch die Inhibition des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4E-bindendes Protein 1 (4E-BP1) bewirkt (Ali & Sabatini, 2005; Bodine et al., 2001; Ohanna et al., 2005; Ruvinsky & Meyuhass, 2006) (s. Abbildung 3). Dieser Prozess wird durch die Suppression der Aktivität des Tuberösen-Sklerose-Komplex 1/2 (TSC1/2), der Glykogen-Synthase-Kinase 3B (GSK3B) sowie des Forkhead-Box-Proteins O3 (FOXO3) verstärkt, die der Proteinsynthese entgegenwirken (Cross et al., 1995; Dreyer et al., 2006; Inoki et al., 2002; Vyas et al., 2002). FOXO3 stellt einen Atrophie-induzierenden Transkriptionsfaktor dar, welcher zu einer gesteigerten Aktivierung der Ubiquitin-Ligasen Atrogin-1 sowie muscle RING-finger Protein 1 (MURF1) führt und somit die Proteindegradation fördert (Sandri et al., 2004; Sartorelli & Fulco, 2004; Stitt et al., 2004) (s. Abbildung 3).

Darüber hinaus führt die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen zu einem gesteigerten Muskelwachstum. Dieser Prozess wird maßgeblich durch die Muskel-regulierenden Transkriptionsfaktoren (MRFs) myogener Faktor 3 (MYOD), Myogenin (MYOG) sowie myogener Faktor 6 (MRF4) kontrolliert (Zammit et al., 2004), die durch funktionelle Belastung induziert werden (Ishido et al., 2004; Li et al., 2006; Petrella et al., 2006).

Repetitiver mechanischer Stress auf Muskelfasern führt zudem zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Hamada et al., 2005; Peake et al., 2005).

Mitglieder der transforming growth factor  $\beta$ - (TGF $\beta$ -)Familie, insbesondere Myostatin, Aktivine und TGF $\beta_1$ , fördern über die Aktivierung von SMAD2 und SMAD3 die Proteindegradation und Inhibition der Myogenese (De Angelis et al., 1998; Liu et al., 2001; Liu et al., 2004; Sartori et al., 2009). Unter physiologischen Bedingungen wird diese Signalkaskade jedoch durch die Mediatoren des AKT-mTORC1-Signalwegs sowie des Hippo-Signalwegs unterdrückt (Goodman et al., 2015; Sartori et al., 2009) (s. Abbildung 3). Die Hippo-Signalkaskade stellt einen hochkonservativen Signalweg dar, welcher essenzielle zelluläre Funktionen einschließlich des zellulären Wachstums und der zellulären Apoptose speziesübergreifend reguliert (Gabriel et al., 2016). Das Yes-assoziierte Protein (YAP), ein Effektormolekül des Hippo-Signalwegs (Watt et al., 2018), wird durch mechanische Überbelastung induziert (Goodman et al., 2015). Dies führt nicht nur zur Inhibition von SMAD2/3, sondern auch zu einer gesteigerten Proliferation von Satellitenzellen durch Aktivierung von MYOD und c-MYC (Goodman et al., 2015; Judson et al., 2012), sowie zu einer gesteigerten Aktivität von mTORC1 (Tumaneng et al., 2012) (s. Abbildung 3). Auf der anderen Seite wird YAP durch TSC1/2 supprimiert (Liang et al., 2014) (s. Abbildung 3). Hierdurch entsteht ein komplexes molekulares Netzwerk zwischen der AKT-mTORC1- und der Hippo-Signalkaskade bei der trainingsinduzierten Adaptation der Skelettmuskulatur.

#### 1.1.2.2 Gen- und Signalwegmodulation in Antwort auf aerobes Training

Im Gegensatz hierzu umfassen die spezifischen Anpassungen an aerobes Training die Steigerung der mitochondrialen Biogenese (Holloszy, 1967), die Erhöhung der aeroben Kapazität der trainierten Muskelfasern durch eine Erhöhung der oxidativen sowie gleichzeitiger Abnahme der glykolytischen Enzyme (Holloszy, 1967; Holloszy et al., 1970; Pette & Heilmann, 1977) und bewirken eine Umwandlung von Muskelfasern vom Typ II in langsame, ermüdungsresistente Fasern vom Typ I (Hawley, 2002) (s. Kapitel 1.1.1).

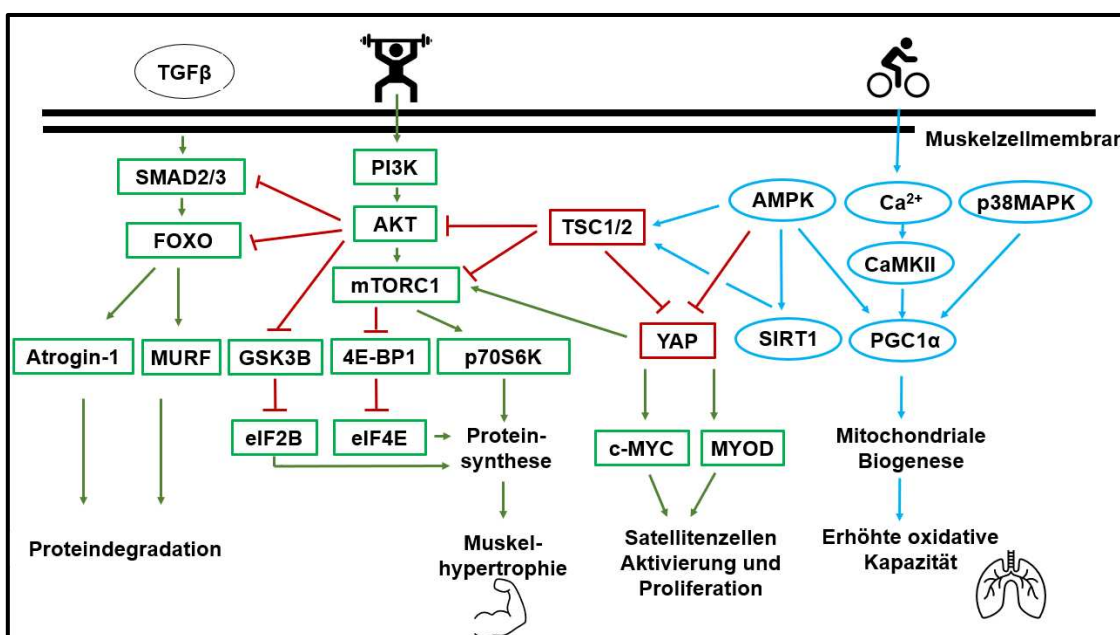
Ausdauertraining führt zu erhöhten intrazellulären Calcium- und Laktatkonzentrationen, erhöhten Spiegeln an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie erhöhten Adenosinmonophosphat (AMP)/ATP- und NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnissen (Coffey & Hawley, 2007). Diese Veränderungen aktivieren die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) (Hayashi et al., 2000), die Calcium-

Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (Chin, 2005) sowie die p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38MAPK) (Wright et al., 2007), die wiederum zu einer Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- $\gamma$ -Koaktivators 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) führen (Akimoto et al., 2008; Czubryt et al., 2003; Liu et al., 2005; Zhao et al., 1999) (s. Abbildung 3). PGC1 $\alpha$  stellt dabei einen zentralen Regulator der mitochondrialen Biogenese dar (Baar et al., 2002; Geng et al., 2010; Wu et al., 1999). Durch Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren nuclear respiratory factor 1/2 (NRF1/2), estrogen-related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) und dem mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM) wird die Expression mitochondrialer Gene erhöht (Baar et al., 2002; Czubryt et al., 2003; Michael et al., 2001; Safdar et al., 2011; Scarpulla, 2002; Schreiber et al., 2003; Vega et al., 2000; Wu et al., 1999). Die entsprechenden Enzyme sind an der Regulation der Atmungskette, der Fettsäureoxidation sowie des Glukosemetabolismus beteiligt (Baar et al., 2002; Czubryt et al., 2003; Michael et al., 2001), und induzieren die Konversion von Typ II-Muskelfasern in Typ I-Fasern (Bach et al., 2003; Lin et al., 2002; Santel & Fuller, 2001; Soriano et al., 2006). Diese Adaptationen führen zu einem metabolisch resistenteren Muskelphänotyp während prolongierter körperlicher Belastung durch Erhöhung der mitochondrialen Qualität und Quantität (Cartoni et al., 2005; Coffey & Hawley, 2007; Drake et al., 2016).

Der humane Tumorsuppressor p53 scheint ebenfalls an der Regulation der mitochondrialen Biogenese beteiligt zu sein. Es wurde eine belastungsabhängige Translokation dieses Proteins in die Mitochondrien und Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor TFAM beschrieben (Park et al., 2009; Saleem & Hood, 2013). Darüber hinaus resultiert aus einer Deletion dieses Proteins eine reduzierte Belastbarkeit sowie eine verringerte oxidative Kapazität der Skelettmuskulatur (Park et al., 2009) durch eine reduzierte AMPK-, p38MAPK- sowie CaMKII-Aktivität, gekoppelt mit einer verringerten Transkription der PGC1 $\alpha$ -mRNA und reduzierter PGC1 $\alpha$ -Proteinaktivität (Saleem et al., 2014).

Ausdauertraining führt primär zu einer Steigerung der oxidativen Kapazität (Atherton et al., 2005), gleichzeitig wird jedoch die Proteinsynthese durch die Aktivierung von AMPK sowie der Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) gehemmt (Philp et al., 2011; Philp & Schenk, 2013). Diese aktivieren TSC1/2 wodurch die AKT-

mTORC1-Signalkaskade inhibiert wird (Bolster et al., 2002; Browne et al., 2004; Browne & Proud, 2002; Ghosh et al., 2010; Gwinn et al., 2008) (s. Abbildung 3). Darüber hinaus induziert AMPK die Suppression von YAP (DeRan et al., 2014; Mo et al., 2015; Wang, Li, et al., 2015; Wang, Xiao, et al., 2015) (s. Abbildung 3), und steigert die Proteindegradation sowohl über das FOXO3-abhängige Ubiquitin-Proteasom-System (Nakashima & Yakabe, 2007; Sanchez et al., 2012) als auch das Unc-51-like Kinase 1-assoziierte Autophagie-/Lysosomen-System (Jung et al., 2009; Sanchez et al., 2012).



**Abbildung 3: Molekulare Mechanismen der trainingsinduzierten Adaptation.** Auf der linken Seite sind die durch Krafttraining induzierten molekularen Veränderungen dargestellt. Krafttraining führt primär zu einer Vergrößerung des Muskelquerschnitts durch erhöhte Proteinsynthese und Aktivierung von Satellitenzellen. Gleichzeitig werden Atrophie-induzierende Signalwege gehemmt. Auf der rechten Seite sind die Signalwege, die an der durch Ausdauertraining induzierten Adaptation beteiligt sind, skizziert. Ausdauertraining induziert einen oxidativen Phänotyp durch Induktion der mitochondrialen Biogenese und gleichzeitiger Inhibition der muskulären Proteinsynthese. PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; AKT = Proteinkinase B; mTORC 1: mechanistic target of rapamycin complex 1; FOXO: Forkhead-Box-Protein O; GSK3B: Glykogen-Synthase-Kinase 3B; eIF2B: eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2B; 4E-BP1: eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E-bindendes Protein 1; eIF4E: eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E; p70S6K: ribosomale Protein-S6-Kinase; TSC1/2: Tuberöser-Sklerose-Komplex 1/2; YAP: Yes-assoziiertes-Protein; AMPK: AMP-aktivierte Proteinkinase; SIRT1: Sirtuin 1; CaMKII: Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; PGC1α: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-γ-Koaktivator 1α; p38MAPK: p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MURF: muscle RING-finger Protein 1; TGFβ: transforming growth factor β; MYOD: myogener Faktor 3.; →: aktivierende Signale; -|: inhibierende Signale; Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA).



## 1.2 Grundlagen der miRNA-Biologie

### 1.2.1 Funktion und Biogenese der miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) gehören zu der großen Familie der nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren (RNAs) und zählen neben Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) und Histon-Modifikationen zu den epigenetischen Regulationsmechanismen (Widmann et al., 2019). Die miRNA-Datenbank miRBase (Version 22) umfasst bis heute die Sequenzen von 1917 Vorläufer- sowie 2654 reifen, im Menschen beschriebenen miRNAs (Kozomara et al., 2018). Neueste Analysen zeigen, dass mehr als 60 % aller menschlicher proteinkodierender Gene miRNA-Zielstellen in ihrer 3'-untranslatierten Region (3'UTR) aufweisen (Friedman et al., 2009). MiRNAs dienen der Feinabstimmung der Genexpression durch Hemmung der Translation oder Degradation der Ziel-mRNA (Bartel, 2009). Auf diese Weise greifen miRNAs regulatorisch in eine Vielzahl von zellulären Mechanismen ein (Friedman et al., 2009) und eine Deregulation der miRNA-Prozessierung wurde mit verschiedenen pathologischen Prozessen, einschließlich der Pathogenese neurodegenerativer und kardiovaskulärer, aber auch muskulärer Erkrankungen, in Verbindung gebracht (Alexander et al., 2013; Calderon-Dominguez et al., 2020; Eisenberg et al., 2007; Greco et al., 2009; Juźwik et al., 2019).

Da miRNAs als epigenetische Regulationsmechanismen zu genetischen Modifikationen führen, wird die Bezeichnung „miRNA-Expression“ häufig angewandt, um die Ausprägung des miRNA-Profiles zu beschreiben. Zwar definiert der Begriff Expression in der Genetik strenggenommen das Ablesen der genetischen Information zur Synthese von Proteinen, jedoch wird im weiteren Sinne auch die Ausprägung des genetischen Phänotyps mit dem Begriff Expression beschrieben (Buccitelli & Selbach, 2020; Nachtomy et al., 2007).

Die Biogenese der miRNAs wird durch die Transkription der primären miRNA (pri-miRNA) durch die RNA-Polymerase II im Nukleus initiiert (Lee et al., 2004). Die pri-miRNA wird anschließend durch einen Proteinkomplex, bestehend aus der Endoribonuklease DROSHA und dem Doppelstrang-RNA-Bindeprotein DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8), zu einem 70 bis 100 Basenpaare umfassenden haarnadelförmigen RNA-Molekül prozessiert (Gregory et al., 2004;

Han et al., 2006). Diese Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) wird in das Zytoplasma transportiert und durch die RNase-III-Endonuklease Dicer in ein ca. 22-Nukleotid großes doppelsträngiges RNA-Molekül gespalten (Bohnsack et al., 2004; Yi et al., 2003). Ein Strang dieses Moleküls wird anschließend selektiv in einem Argonauten-Protein (AGO) verankert, um den RNA-induzierten *Silencing*-Komplex (RISC) zu bilden. Der zweite, funktionell inaktive Strang („Passagierstrang“) wird abgebaut (Macrae et al., 2006). Die reife miRNA kann hierbei entweder von der 5'-Seite oder 3'-Seite der pre-miRNA prozessiert werden und wird dementsprechend als „-5p“- oder „-3p“-Spezies definiert (Macrae et al., 2006; Medley et al., 2021). Prinzipiell können beide Stränge für die RISC-Beladung ausgewählt werden, jedoch überwiegt häufig einer der beiden Stränge (früher auch als „dominanter“ Strang bezeichnet). Eine Unterscheidung zwischen den beiden miRNA-Spezies ist relevant, da beide Stränge biologisch funktionell aktiv sein können (Backes et al., 2018). In etlichen Studien wurde zudem beschrieben, dass die Auswahl des prozessierten Strangs bei einer Vielzahl an miRNAs von der Art des Gewebes sowie den physiologischen Bedingungen abhängig ist (Guo et al., 2014; W. Hu et al., 2014; Marco et al., 2010). Wird in einer Studie die detaillierte Spezies nicht angegeben, wird in der Regel Bezug auf den früher als dominant betrachteten miRNA-Strang genommen. In diesen Fällen wird die Strangspezifität in dieser Arbeit in Klammern zur jeweiligen miRNA-Bezeichnung ergänzt, beispielsweise miR-1(-3p) (gemäß der miRNA-Datenbank miRBase Version 22 (Kozomara et al., 2018)).

### **1.2.2 Skelettmuskelspezifische miRNAs**

MiRNAs sind hochkonservierte Schlüsselregulatoren der Genexpression, die grundlegende zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Stressreaktionen beeinflussen (Bartel, 2004). Jedoch werden einige miRNAs nicht ubiquitär transkribiert, sondern weisen ein gewebe- und zellspezifisches Muster auf (Sempere et al., 2004; Sood et al., 2006). Die Entdeckung der muskelspezifischen bzw. -angereicherten miRNAs miR-1, miR-133a/b, miR-206, sowie miR-208a/b, miR-486 und miR-499a/b (McCarthy, 2008; Sempere et al., 2004; Small et al., 2010; van Rooij et al., 2009; van Rooij et al., 2007) hat das

Verständnis über die molekularen Netzwerke, die die Plastizität der Skelettmuskulatur regulieren, fundamental erweitert. Diese miRNAs werden als myomiRs (myo = Muskel + miR = microRNA) zusammengefasst.

MyomiRs sind dabei maßgeblich an der Regulation der Myogenese und der Aufrechterhaltung der muskulären Homöostase beteiligt (Giagnorio et al., 2021) (s. Abbildung 4). MiR-133a/b und miR-499a(-5p) fördern über die Inhibition des Transkriptionsfaktors serum response factor (SRF) bzw. der Inhibition der Expression des Kollagen-Typ 25 alpha-1-Gens (*COL25A1*) die Myoblasten-Proliferation (Chen et al., 2006; Gonçalves et al., 2019). Auf der anderen Seite induziert miR-133a/b, ebenso wie miR-1(-3p), miR-206 und miR-486(-5p), die Differenzierung von Myoblasten u. a. durch Inhibition der Transkriptionsfaktoren paired box 3 und 7 (*PAX3* und *PAX7*), deren Funktion die Aufrechterhaltung der Quieszenz von Muskelstammzellen darstellt. Durch diese Suppression wird die Fusion der Myoblasten und somit die Formation neuer Muskelfasern ermöglicht (Cui et al., 2019; Dey et al., 2011; Goljanek-Whysall et al., 2011) (s. Abbildung 4). Diese Prozesse spielen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur als auch bei der Regeneration und Adaptation des Skelettmuskels nach physischer Belastung.

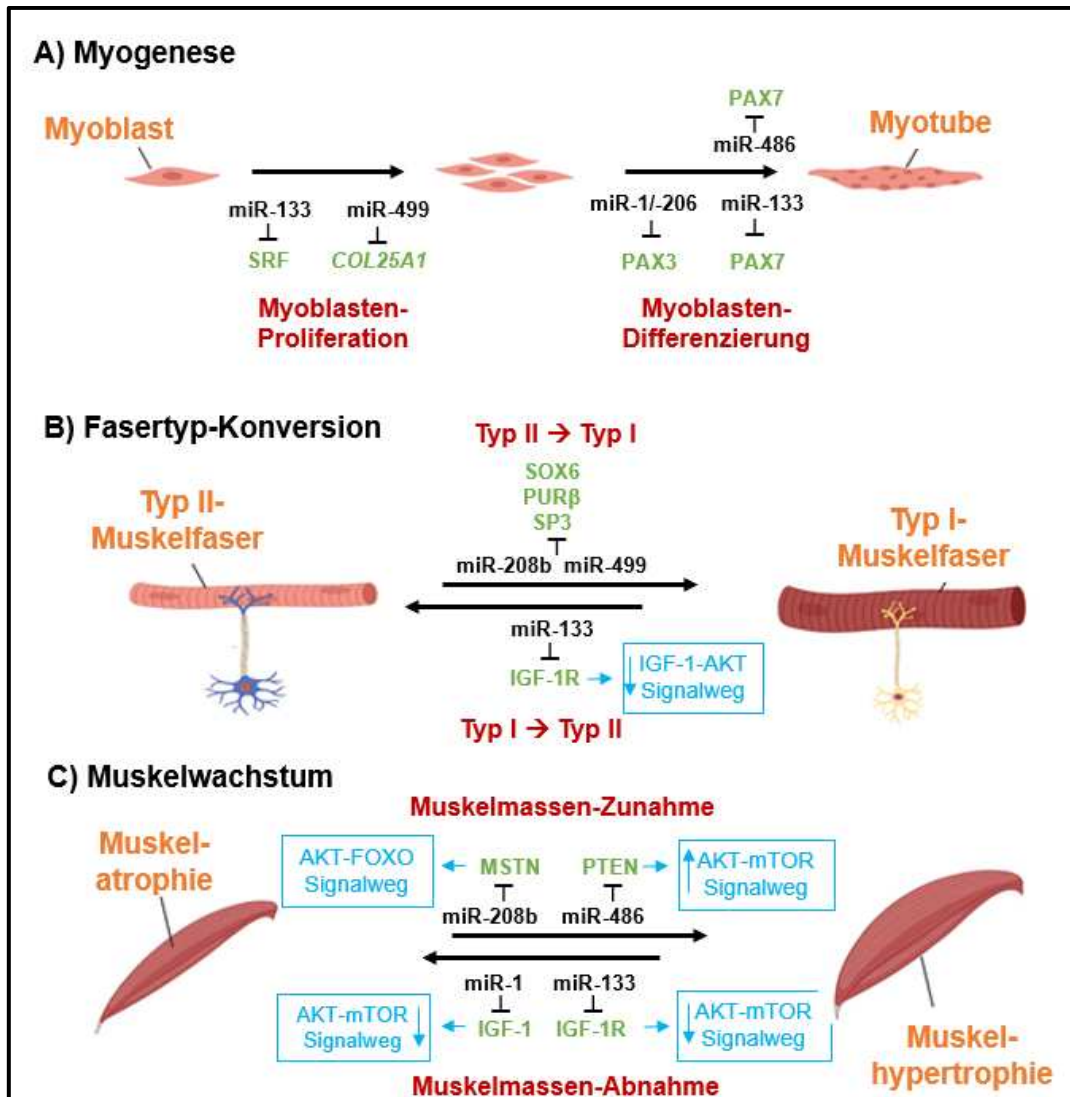
Die teilweise Umwandlung der Typ II- in Typ I-Muskelfasern führt zu einem eher oxidativen Phänotyp, woraus eine erhöhte Ermüdungsresistenz der Muskulatur resultieren könnte (Schiaffino & Reggiani, 2011). MiR-208b und miR-499a(-5p) aktivieren diese Fasertyp-Konversion durch die gesteigerte Expression der myosin heavy chain 7 (*MHY7*), wodurch die Bildung der für Typ I-Fasern typischen Isoform der Myosin-Schwerkette induziert wird (Callis et al., 2009; van Rooij et al., 2008; van Rooij et al., 2009). Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus wird zudem die Transkription von miR-208b und miR-499a(-5p) nach aerobem Training über die gesteigerte Aktivität von PGC1 $\alpha$  stimuliert (Gan et al., 2013) (s. Abbildung 4).

Die beiden myomiRs miR-486(-5p) und miR-208b steigern zudem die Proteinsynthese und das Muskelwachstum. MiR-486(-5p) inhibiert die Aktivität des phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) (Alexander et al., 2011; Alexander et al., 2014), während miR-208b die Aktivität von Myostatin supprimiert (Boon et

al., 2015). Hierdurch wird eine gesteigerte Phosphorylierung und Aktivierung von AKT und nachfolgend mTORC1 sowie die Hemmung von FOXO3 induziert (Alexander et al., 2011; Alexander et al., 2014; Boon et al., 2015) (s. Abbildung 4).

Im Gegensatz hierzu tragen miR-1(-3p), miR-133a sowie miR-206 zu einer negativen Regulation der Muskelhypertrophie bei, indem sie positive Modulatoren des AKT-mTORC1-Signalwegs (IGF-1, IGF-1-Rezeptor (IGF-1R)) supprimieren (Elia et al., 2009; Huang et al., 2011; Kukreti et al., 2013; Yan et al., 2013) (s. Abbildung 4).

MyomiRs werden nicht nur in der Skelettmuskulatur exprimiert, sondern auch in niedrigen Konzentrationen in anderen Gewebetypen. Darüber hinaus können myomiRs, wie auch andere miRNA-Spezies, in den Blutkreislauf freigesetzt und in Plasma- oder Serumproben gemessen werden (Siracusa et al., 2018; Weber et al., 2010). Die Bedeutung dieser zirkulierenden myomiRs ist noch nicht vollständig erforscht, jedoch konnte eine Veränderung von miR-1(-3p), miR-133a, miR-206 sowie miR-486(-5p) im Blutplasma in Reaktion auf körperliche Belastung nachgewiesen werden (Aoi et al., 2013; Gomes et al., 2014).



**Abbildung 4: Funktion der muskelspezifischen miRNAs.** (A) Funktion der myomiRs bei der Myogenese: MiR-133a/b und miR-499(-5p) fördern die Proliferation von Myoblasten durch Inhibition von SRF und Inhibition der Expression von *COL25A1*. MiR-133a/b und miR-486(-5p) induzieren durch Inhibition von PAX7, miR-1(-3p) und miR-206 durch Inhibition von PAX3 die Differenzierung von Myoblasten. (B) Funktion der myomiRs in der Fasertyp-Konversion: MiR-208b und miR-499(-5p) fördern die Bildung von langsam zuckenden (Typ I-)Muskelfasern durch Inhibition von SOX6, PURβ und SP3. MiR-133a induziert die Bildung von schnell zuckenden (Typ II-)Muskelfasern durch Inhibition von IGF-1R. (C) Funktion der myomiRs bei der Regulation der Muskelmasse: MiR-208b und miR-486(-5p) fördern das Muskelwachstum durch Inhibition von MSTN und nachfolgend reduzierter Aktivierung von FOXO3 sowie durch Inhibition von PTEN, die mit einer verstärkten Aktivierung von mTORC1 einhergeht. MiR-1(-3p) und miR-133a hemmen das Muskelwachstum durch Inhibition von IGF-1 bzw. dessen Rezeptors. SRF: serum response factor; *COL25A1*: Kollagen-Typ 25 alpha-1-Gen; PAX: paired box; SOX6: SRY-related HMG-box 6; PURβ: purine-rich element binding protein β; SP3: specificity protein 3; IGF-1R: insulin-like growth factor 1 receptor; IGF-1: insulin-like growth factor 1; MSTN: Myostatin; PTEN: phosphatase and tensin homolog; mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1; FOXO: Forkhead-Box-Protein O. ⊥: inhibierende Signale; ↑: Induktion; ↓: Repression. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA), modifiziert nach Giagnorio et al. (2021).

### **1.2.3 Funktion der miRNAs bei der trainingsinduzierten Adaptation der Skelettmuskulatur**

#### 1.2.3.1 Rolle von miRNAs im Kraftsport

Eine Vielzahl an Studien untersuchte bereits die Regulation und Funktion zirkulierender miRNAs in Reaktion auf Kraft- und Ausdauertraining (Baggish et al., 2011; Bye et al., 2013; Cui et al., 2017; D'Souza et al., 2017; Li et al., 2018; Zhou et al., 2020). Die Veränderungen des miRNA-Profiles im Skelettmuskel nach Krafttraining und insbesondere nach aerobem Training wurde jedoch bis *dato* in einer deutlich geringeren Anzahl an Humanstudien analysiert, wobei die Art, Dauer und Frequenz der Trainingseinheiten sowie das untersuchte Proband\*innenkollektiv stark variierte (Fochi et al., 2020). Es konnte jedoch klar nachgewiesen werden, dass die Erhöhung oder Verringerung der Transkription spezifischer miRNAs im Skelettmuskelgewebe zu einer Modulation des Genexpressionsprofils der Myozyten führt, und es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass diese Veränderungen an der Feinabstimmung der trainingsinduzierten Anpassungsreaktionen beteiligt sind (Fochi et al., 2020; Kirby & McCarthy, 2013; Ultimo et al., 2018; Zacharewicz et al., 2013), wodurch beispielsweise die Bildung der für Typ I-Fasern typischen Isoform der Myosin-Schwerkette induziert wird (Masi et al., 2016).

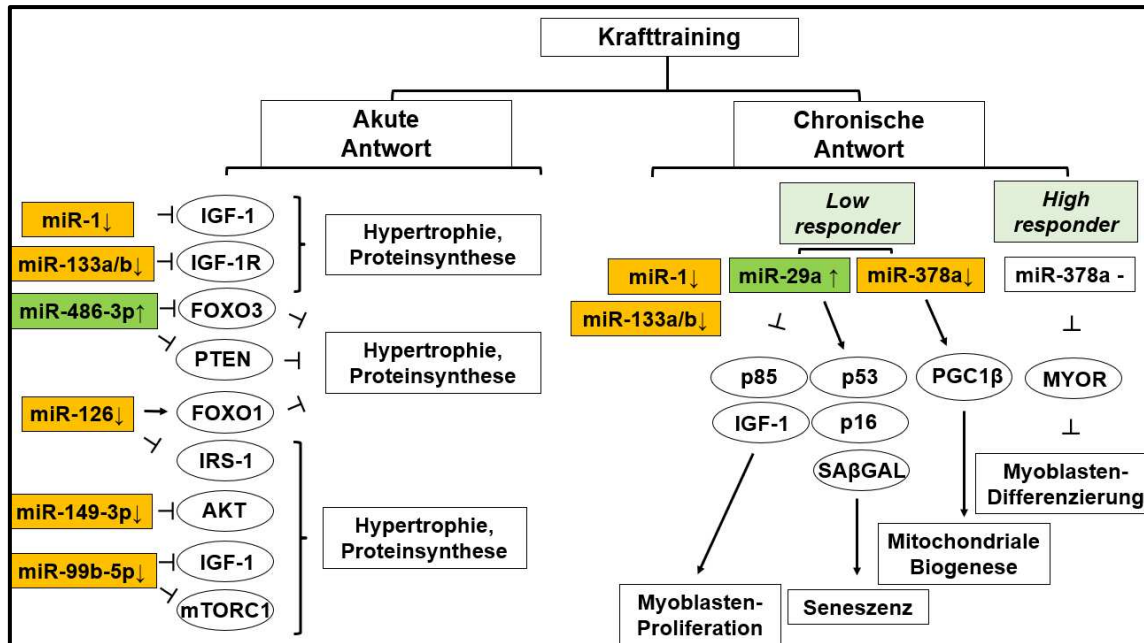
Sowohl in Reaktion auf eine akute als auch nach chronischer Belastung wurde dabei insbesondere eine Reduktion von miR-1(-3p) und miR-133a/b (Drummond et al., 2008; McCarthy & Esser, 2007; Mueller et al., 2011; Ringholm et al., 2011; Rivas et al., 2014) sowie eine Induktion von miR-486-3p in der Skelettmuskulatur nachgewiesen (D'Souza et al., 2017; Zacharewicz et al., 2014) (s. Abbildung 5). Die Suppression von miR-1(-3p) und miR-133a/b führt zu einer gesteigerten Aktivierung des AKT-mTORC1-Signalwegs (Elia et al., 2009; Huang et al., 2011; Kukreti et al., 2013; Mueller et al., 2011), wohingegen die Zunahme von miR-486-3p in einer Inhibition von FOXO3 sowie PTEN resultiert (Small et al., 2010). Hierdurch werden die Proteinsynthese und das Muskelwachstum gefördert (s. Abbildung 3 und 4).

Darüber hinaus existieren bereits Daten zu miR-99a-5p, miR-99b-5p, miR-100-5p, miR-126, miR-149-3p, miR-196b-5p und miR-199a(-5p), welche als

Regulatoren von Proteinsynthesewegen in verschiedenen Zelltypen beschrieben wurden (Doghman et al., 2010; Fornari et al., 2010; Hou et al., 2014; Jia et al., 2013; Jin et al., 2013; Lerman et al., 2011; Lin et al., 2010). Die Mitglieder der miR-99/100-Familie (miR-99a-5p, miR-99b-5p und miR-100-5p) sowie miR-199a(-5p), miR-126 und miR-149-3p inhibieren die Translation verschiedener Proteine des IGF-1-AKT-mTORC1-Signalwegs und wirken somit der Proteinsynthese entgegen (Fornari et al., 2010; Jia et al., 2013; Jin et al., 2013; Lin et al., 2010; Rivas et al., 2014; Wei et al., 2013). MiR-196b-5p bindet hingegen an die 3'UTR der FOXO1-mRNA und könnte somit die Induktion einer Muskelhypertrophie positiv beeinflussen (Hou et al., 2014). In Einklang mit diesen Erkenntnissen wurde eine Reduktion von miR-99b-5p und miR-149-3p (Zacharewicz et al., 2014) sowie miR-126 (Rivas et al., 2014) nach einer akuten Kraftübung detektiert (s. Abbildung 5). Zudem zeigten sich in der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur altersabhängige Differenzen in der Weise, dass miR-196b-5p ausschließlich in älteren Testpersonen (Alter:  $66,6 \pm 1,1$  Jahre vs.  $24,2 \pm 0,9$  Jahre) induziert sowie miR-99a-5p in diesen reprimiert wurde (Zacharewicz et al., 2014). Dies könnte eine Erklärung für die reduzierte Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur im Alter darstellen, welche mit einer reduzierten Aktivierung des AKT-mTORC1-Signalwegs einhergeht (Kumar et al., 2009; Zacharewicz et al., 2014).

Von besonderem Interesse ist zudem die Regulation von miR-378a in Reaktion auf Krafttraining, da diese miRNA sowohl in die mitochondriale Biogenese als auch in die Myogenese regulatorisch einzugreifen scheint (Carrer et al., 2012; Eichner et al., 2010; Gagan et al., 2011) (s. Kapitel 1.2.3.2). Nach einem mehrwöchigen Training zeigte sich in einer Gruppe von Testpersonen, die auf Krafttraining mit einer weniger stark ausgeprägten Muskelhypertrophie reagierten („*low responder*“), eine signifikant reduzierte Expression von miR-378a(-3p) sowie erhöhte Werte von miR-451a (Davidsen et al., 2011) und miR-29a(-3p) (Ogasawara et al., 2016) (s. Abbildung 5). Die Reduktion von miR-378a(-3p) war hierbei mit einer reduzierten Aktivität von IGF-1, VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) sowie des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4E (eIF4E) assoziiert (Davidsen et al., 2011). MiR-29a(-3p) supprimiert zudem

Mediatoren der Myoblasten-Proliferation (p85a, IGF-1) und induziert zelluläre Seneszenz-Proteine (p53, p16, Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA $\beta$ GAL)), wodurch das muskuläre Wachstum gehemmt wird (Z. Hu et al., 2014) (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: MiRNA-Regulation in der Skelettmuskulatur in Reaktion auf Krafttraining.** Links: Bei der Akutantwort kommt es zu einer Abnahme von miR-1(-3p), miR-133a/b, miR-126, miR-149-3p und miR-99b-5p. Hierdurch kommt es zu einer Aufhebung der Hemmung des IGF-1-AKT-mTORC1-Signalwegs, wodurch die Proteinsynthese und das Muskelwachstum gefördert werden. Die Zunahme von miR-486-3p führt zu einer Inhibition von FOXO3 und PTEN, wodurch Atrophie-induzierende Signale reduziert werden. Rechts: Bei der chronischen Antwort der Skelettmuskulatur zeigt sich ebenfalls eine Reduktion von miR-1(-3p) und miR-133a/b. Bei Testpersonen, die eine weniger starke Hypertrophie-Reaktion zeigen (= *low responder*) kommt es zu einer Reduktion von miR-378a(-3p) sowie Zunahme von miR-29a(-3p), wodurch die Myoblasten-Proliferation inhibiert wird sowie Seneszenz-Proteine und Regulatoren der mitochondrialen Biogenese aktiviert werden. AKT = Proteinkinase B; FOXO: Forkhead-Box-Protein O; PGC1: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$ -Koaktivator 1; IGF-1: insulin-like growth factor 1; IGF-1R: insulin-like growth factor 1 receptor; IRS-1: insulin receptor substrate 1; PTEN: phosphatase and tensin homolog; SA $\beta$ GAL: Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase; mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1; VEGF: vascular endothelial growth factor; eIF4E: eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E;  $\uparrow$ : Induktion;  $\downarrow$ : Repression;  $\rightarrow$ : aktivierende Signale;  $-|$ : inhibierende Signale. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA).



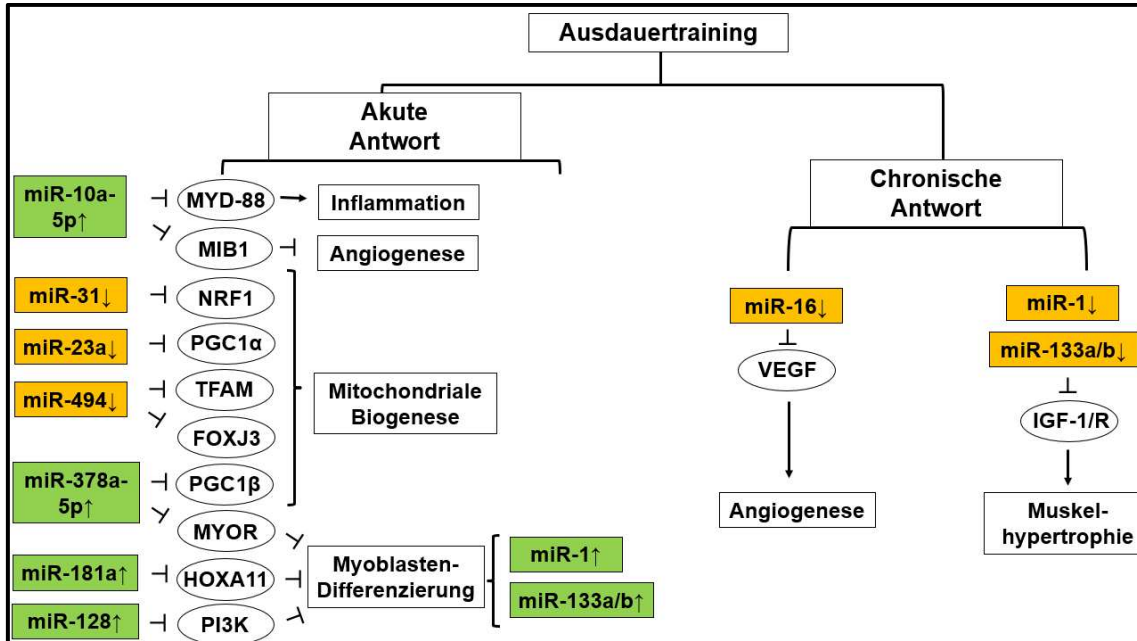
### 1.2.3.2 Rolle von miRNAs im Ausdauersport

Die mitochondriale Biogenese stellt einen Hauptmechanismus der trainingsinduzierten Adaptation nach Ausdauertraining dar. In diesen Prozess scheinen miR-31 sowie miR-23a regulatorisch einzugreifen. Die Abnahme von miR-31(-5p) und miR-23a(-3p) nach einer akuten aeroben Belastung resultierte in einer Erhöhung von NRF1 (Russell et al., 2013) bzw. PGC1 $\alpha$  (Safdar et al., 2009) (s. Abbildung 6), welche beide positive Regulatoren der mitochondrialen Biogenese darstellen (Baar et al., 2002; Geng et al., 2010; Wu et al., 1999). Des Weiteren wurde in Reaktion auf Ausdauertraining eine Reduktion von miR-494 detektiert, die mit einer erhöhten Aktivität von TFAM sowie des Forkhead-Box-Proteins J3 (FOXJ3) einherging. Daher scheint diese miRNA ebenfalls an der Regulation der mitochondrialen Biogenese beteiligt zu sein (Yamamoto et al., 2012) (s. Abbildung 6). Jedoch wurde dieser Zusammenhang bisher nur *in vitro* sowie *in vivo* in Mausmodellen nachgewiesen.

Darüber hinaus wurde ein Anstieg von miR-378a-5p, miR-128(-3p) sowie miR-10a-5p nach einer akuten aeroben Belastung postuliert (McLean et al., 2015). Beide miR-378a-Spezies werden innerhalb des Introns von *PPARGC1b*, welches PGC1 $\beta$  kodiert, transkribiert (Eichner et al., 2010). Auf der anderen Seite inhibiert miR-378a die Aktivität von PGC1 $\beta$  sowie Enzymen der Fettsäureoxidation (Carrer et al., 2012; Eichner et al., 2010; Gerin et al., 2010; McLean et al., 2015). Hieraus resultiert eine verringerte mitochondriale Biogenese, eine geringere zelluläre Energieversorgung und in der Folge eine geringere Leistungsfähigkeit (Carrer et al., 2012; Eichner et al., 2010; Gerin et al., 2010). Eine Zunahme von miR-378a-5p sowie miR-128(-3p) führt zudem zu einer gesteigerten Aktivität von MYOR, wodurch die Differenzierung der Myoblasten aktiviert wird (Gagan et al., 2011; Lu et al., 1999; Motohashi et al., 2013) (s. Abbildung 6). Dies könnte dazu beitragen, die muskulären Schäden, die durch eine akute Belastung ausgelöst werden, zu reparieren, und die Homöostase aufrechtzuerhalten.

MiR-10a-5p fördert hingegen die Angiogenese (Wang et al., 2016) und inhibiert proinflammatorische Signale (Pham et al., 2020). Durch die Steigerung der Kapillardichte kommt es zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung des

Gewebes, wodurch die Belastbarkeit gesteigert werden kann. In diesen Prozess scheinen zudem miR-15a(-5p), miR-16(-5p) sowie miR-126(-3p) durch Inhibition von VEGF involviert zu sein (Fish et al., 2008; Sun et al., 2013; Wang et al., 2008). Eine Reduktion von miR-16(-5p) zeigte sich nach einem mehrwöchigen Ausdauertraining in Ratten und ging mit einer gesteigerten Aktivität von VEGF und Bildung neuer Endothelgefäße einher (Fernandes et al., 2012) (s. Abbildung 6). Jedoch liegen über die Regulationsmechanismen dieser miRNAs im Ausdauersport in humanem Skelettmuskelgewebe bisher erst wenige Daten vor. In den Prozess der Muskelregeneration nach einer akuten aeroben Belastung greifen außerdem miR-1(-3p), miR-133a/b sowie miR-181a(-5p) regulatorisch ein. Diese miRNAs zeigten in mehreren Studien eine signifikante Zunahme bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur (Nielsen et al., 2010; Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009). Diese Erhöhung ging mit der Zunahme zahlreicher Transkriptionsfaktoren der MRF-Familie einher, die maßgeblich an der Plastizität der Muskulatur beteiligt sind (Coffey et al., 2006; Kadi et al., 2004; Naguibneva et al., 2006; Nielsen et al., 2010; Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009; Sweetman et al., 2008) (s. Abbildung 6). Nach mehrwöchigem Ausdauertraining wurde jedoch eine Reduktion von miR-1(-3p) sowie miR-133a/b festgestellt (Keller et al., 2011; Nielsen et al., 2010) (s. Abbildung 6). Dies legt die Hypothese nahe, dass das miRNA-Profil und damit auch die molekularen Signalwege im Muskel vom Trainingsstatus einer Person beeinflusst werden (Fernandez-Gonzalo et al., 2013).



**Abbildung 6: MiRNA-Regulation in der Skelettmuskulatur in Reaktion auf Ausdauertraining.** Links: Bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur zeigt sich eine Abnahme von miR-31(-5p), miR-23a(-3p) und miR-494, wodurch die mitochondriale Biogenese durch gesteigerte Aktivität von NRF1, PGC1 $\alpha$ , TFAM und FOXJ3 induziert wird. Zudem kommt es zu einer Induktion von miR-378a-5p, miR-181a(-5p), miR-128(-3p), miR-1(-3p) und miR-133a/b. Dies fördert die Myoblasten-Differenzierung über die gesteigerte Aktivität der Transkriptionsfaktoren der MRF-Familie. Die Zunahme von miR-10a-5p führt zur Induktion der Angiogenese durch Inhibition von MIB1 sowie Inhibition von proinflammatorischen Signalen durch Suppression von MYD-88. Rechts: Die chronische Adaptation an Ausdauertraining führt zu einer Repression von miR-16(-5p) und in Folge zu einer gesteigerten Aktivität von VEGF sowie zu einer erhöhten Angiogenese. MiR-1(-3p) und miR-133a/b zeigen ebenfalls eine Abnahme. Dies resultiert über die erhöhte Aktivität von IGF-1 und dessen Rezeptors (IGF-1R) in einem verstärkten Muskelwachstum. PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; NRF1: nuclear respiratory factor 1; PGC1: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$ -Koaktivator 1; TFAM: mitochondrialer Transkriptionsfaktor A; FOXJ3: Forkhead-Box-Protein J3; MYOR: myogener Repressor; HOXA11: Homeobox A11; VEGF: vascular endothelial growth factor; IGF-1: insulin-like growth factor 1; IGF-1R: insulin-like growth factor 1 receptor; MYD-88: myeloid differentiation primary response 88; MIB1: E3 Ubiquitin-Protein-Ligase;  $\uparrow$ : Induktion;  $\downarrow$ : Repression;  $\rightarrow$ : aktivierende Signale;  $-|$ : inhibierende Signal. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

## Zielsetzung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich eine akute Ausdauerbelastung auf das miRNA-Profil des Skelettmuskels auswirkt und ob die Variabilität der trainingsinduzierten physiologischen Adaptation auf ein mehrwöchiges Ausdauertraining mit einer unterschiedlichen miRNA-Regulation bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur korreliert. Insbesondere sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1) Wie verändert sich das miRNA-Expressionsprofil der Skelettmuskulatur in Reaktion auf eine einzelne aerobe Belastung?

Hierfür werden zunächst Skelettmuskelproben von sechs Teilnehmerinnen einer prospektiven Trainingsstudie mittels Mikroarray analysiert, um vollständige und nicht-selektive Datensätze zur Veränderung von miRNA-Profilen in der Skelettmuskulatur in Reaktion auf eine akute aerobe Belastung zu generieren.

2) Ist die Mikroarray-Technik ein effizientes *Screening-Tool* für die Analyse von individuellen miRNA-Profilen und sind diese Daten mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) unter Einsatz von *locked nucleic acid*- (LNA-) *Primern* reproduzierbar?

In einem zweiten Schritt werden die Expressionsmuster ausgewählter miRNAs in einem größeren Kollektiv ( $n = 29$ ) in qPCR-Experimenten weiterführend analysiert. Hierdurch soll die Reproduzierbarkeit der Mikroarray-Daten mittels qPCR evaluiert werden und gleichzeitig die Eignung der qPCR-Technologie unter dem Einsatz von LNA-*Primern*, welche eine neue Klasse an modifizierten Oligonukleotiden mit erhöhter Sensitivität und Spezifität darstellen, als Validierungsinstrument bewertet werden.

3) Kann die spätere Trainingsreaktion in Abhängigkeit der Veränderung des individuellen miRNA-Musters in Antwort auf eine einzelne Akutbelastung vor Beginn des Trainings vorhergesagt werden?

Um diese Frage zu beantworten, werden die Akutmuster der analysierten miRNAs mit der Veränderung der Ausdauerleistungsfähigkeit, insbesondere den individuellen Veränderungen der  $\dot{V}O_2\text{max}$  ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ ) nach einem mehrwöchigen Training, korreliert. Eine attraktive Hypothese ist, dass die spätere

Trainingsreaktion in Abhängigkeit des individuellen miRNA-Musters der Skelettmuskulatur in Antwort auf eine einzelne Akutbelastung vor Beginn des Trainings vorhergesagt werden kann. Dies würde eine „personalisierte Trainingsmedizin“ ermöglichen, im Sinne einer individualisierten Gestaltung von Trainingsplänen vor dem Hintergrund einer bestimmten Person und in Hinblick auf ein spezifisch angestrebtes Ergebnis. Dies könnte sowohl im Wettkampf als auch im therapeutischen und rehabilitativen Bereich zu einer Verbesserung des Trainingsansprechens führen und die Effizienz von Training erhöhen.

## 2 Material, Proband\*innenkollektiv und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Artikel	Hersteller
MIKRO 200 R-Laborzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
SPROUT Tischzentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Multifuge X1-Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
iCycler Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
BeadBug Mikrotube-Homogenizer	Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vortexer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
CFX96 Touch Real-Time PCR- Detektionssystem	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette 2 – 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette 10 - 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Nalgene 4150 - 2000 HDPE 2 L Dewar Flask	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Artikelnummer (Art. Nr.) und Herstellerangaben**

Artikel	Art. Nr.	Hersteller
Dualfilter-Pipettenspitzen 0,1 – 10 µl	0030078519	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Dualfilter-Pipettenspitzen 2 – 20 µl	022491270	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Dualfilter-Pipettenspitzen 2 -100 µl	0030078543	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Biosphere plus Filterspitzen 50 - 1250 µl	70.1186.210	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Safe-Lock Microtubes 1,5 ml	0039120086	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Microseal 'B' PCR-Platten- Versiegelungsfolie, adhäsiv	MSB 1001	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
PCR-Platten (weiß)	72.1980.232	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
PCR SoftTubes, 0,2 µl, farblos	711080	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Precellys-Keramik-Röhrchen, 2 ml; befüllt mit 1,4/2,8 mm Keramikkügelchen	431-0170	Berthin GmbH, Frankfurt am Main, DE

### 2.1.3 Komplettssets

**Tabelle 3 Verwendete Komplettssets mit Art. Nr. und Herstellerangaben**

Artikel	Art. Nr.	Hersteller
miRNeasy Micro Kit (50)	217084	Qiagen, Hilden, DE
miRCURY LNA RT Kit	339340	Qiagen, Hilden, DE
miRCURY RNA Spike-In Kit, for RT	339390	Qiagen, Hilden, DE

### 2.1.4 Oligonukleotide

**Tabelle 4: Verwendete PCR-Primer mit Katalognummer (Kat. Nr.) und Herstellerangaben**

<b>miRNA</b>	<b>Gene Globe</b>	<b>Kat. Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
hsa-miR-1-3p	YP00204344	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-133a-3p	YP00204788	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-133a-5p	YP00205501	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-133b	YP00206058	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-499a-5p	YP00205935	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-23a-5p	YP00205631	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-378a-5p	YP00204347	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-199a-5p	YP00204494	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-199a-3p	YP00204536	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-15a-5p	YP00204066	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-18a-5p	YP00204207	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-19b-3p	YP00204450	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-27a-3p	YP00206038	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-155-5p	YP02119311	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-497-5p	YP00204354	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-4743-5p	YP02115797	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-7151-3p	YP02108098	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-132-3p	YP00206035	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-4330	YP02105730	339306	Qiagen, Hilden, DE
SNORD48a	YP00203903	339306	Qiagen, Hilden, DE
SNORD49	YP00203904	339306	Qiagen, Hilden, DE
hsa-miR-423-3p	YP00204488	339306	Qiagen, Hilden, DE
U6	YP00203907	339306	Qiagen, Hilden, DE
UniSp6	YP00203954	339306	Qiagen, Hilden, DE



### 2.1.5 Chemikalien

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien mit Art. Nr. und Herstellerangaben**

<b>Chemikalien</b>	<b>Art. Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Trichlormethan/Chloroform	33134	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE

### 2.1.6 Computerprogramme

**Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme mit Angaben des Urhebers**

<b>Programm</b>	<b>Urheber bzw. Referenz</b>
CFX Manager, Version 3.0	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
IBM SPSS Statistics, Version 27	IBM, Armonk, NY, USA
EndNote 20.3	Clarivate Analytics, London, UK
Microsoft Excel 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Windows 7	Microsoft Redmond, WA, USA
Microsoft PowerPoint 2019	Microsoft Redmond, WA, USA
Transcriptome Analysis Console (TAC), Version 4.0.2.15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Q-Power, Version 3.1.9.6	Faul et al. (2007)

## **2.2 Ethische Grundlagen**

Das in dieser Arbeit durchgeführte Projekt ist Teil der iReAct-Studie ("*individual response to physical activity*"), das die individuellen biopsychosozialen Aspekte der trainingsinduzierten Anpassung analysiert (Thiel et al., 2020). Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und wurde durchgehend von Ärzten sowie geschultem Personal der Abteilung für Sportmedizin des Universitätsklinikums Tübingen überwacht. Die Genehmigung für diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen am 22. Januar 2018 erteilt (Aktenzeichen: 882/2017BO1). Alle Teilnehmer\*innen wurden vollständig über den Ablauf der Studie, die möglichen Risiken, die Datenspeicherung sowie die Vertraulichkeit und Anonymität der Daten informiert. Das schriftliche Einverständnis für die Teilnahme an der Studie sowie die Nutzung und Veröffentlichung der Daten für Forschungszwecke wurde von allen Testpersonen eingeholt.

## **2.3 Untersuchtes Proband\*innenkollektiv**

Im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit wurden in einem ersten Schritt Skelettmuskelbiopsien von sechs Probandinnen mit Hilfe der miRNA-Mikroarray-Technik untersucht. Ziel dieses explorativen Ansatzes war es, erste Hypothesen zu generieren, die in einem zweiten Schritt mittels qPCR-Analyse weiterführend untersucht werden sollten. In diese qPCR-Untersuchung wurde eine größere Kohorte gesunder, weiblicher Testpersonen (n = 29) miteingeschlossen. Die demografischen und physiologischen Daten wurden durch die Mitglieder des Forschungsteams der Abteilung Sportmedizin des Universitätsklinikums Tübingen erhoben. Eine detaillierte Übersicht über die Charakteristika der Studien-Teilnehmer\*innen der iReAct-Studie kann (Maturana et al., 2021) entnommen werden.

### **2.3.1 Anthropometrische Daten**

In Tabelle 7 sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der physiologischen Daten der Teilnehmerinnen, die in diese Arbeit eingeschlossen wurden (n = 29), sowie detailliert die Werte der sechs Probandinnen, deren



in den letzten sechs Monaten vor Beginn der Studie keine regelmäßige sportliche Aktivität ausgeübt (Thiel et al., 2020).

## **2.4 Methoden**

### **2.4.1 Ermittlung der $\dot{V}O_2\text{max}$**

Als Marker der trainingsinduzierten Adaptation wurden in dieser Arbeit die  $\dot{V}O_2\text{max}$  und die erbrachte Leistung an der  $LT_2$  ( $LTP_2$ , englisch *lactat threshold power 2*) betrachtet. Diese physiologischen Parameter wurden im Rahmen der iReAct-Studie routinemäßig durch das Team der Abteilung Sportmedizin des Universitätsklinikums Tübingen erhoben (Thiel et al., 2020). Zur Bestimmung der  $\dot{V}O_2\text{max}$  wurde zu Beginn der Studie sowie nach Beendigung der jeweiligen Trainingsblöcke ein Stufentest auf einem Fahrradergometer (Ergoselect 200, Ergoline GmbH, Bitz, Deutschland) bis zur subjektiven Erschöpfung der Testperson durchgeführt. Die Leistungsintensität wurde, beginnend mit 25 W, alle drei Minuten um weitere 25 W gesteigert (bezogen auf die weiblichen Testpersonen), wobei die kardialen Parameter kontinuierlich überwacht wurden (12-Kanal-PC-EKG, custo med GmbH, Ottobrunn, Deutschland). Der pulmonale Gasaustausch und die Ventilation wurden mit einem portablen Spiroergometrie-System (MetaLyzer, CORTEX Biophysics, Leipzig, Deutschland) gemessen. Die  $\dot{V}O_2$ -Daten wurden wie folgt bearbeitet: Datenpunkte, die außerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls lagen ( $= MW \pm (2 \times SD)$ ) wurden als Ausreißer betrachtet und entfernt. Anschließend wurden die Daten sekundenweise quantifiziert und in 30-Sekunden-Blöcken zusammengefasst (Maturana et al., 2021). Gemäß den Empfehlungen des American College of Sports Medicine (Ferguson, 2014) wurde das Erreichen der  $\dot{V}O_2\text{max}$  anhand der folgenden Kriterien definiert: i) eine  $HF_{\text{max}}$  von zehn Schlägen pro Minute (bpm) unter der vorhergesehenen altersabhängigen  $HF_{\text{max}}$  ( $220 - \text{Lebensalter}$ ); ii) eine  $RER > 1,1$  % oder iii) eine maximale Blutlaktatkonzentration  $> 8$  mmol/l (Maturana et al., 2021).

### **2.4.2 Ermittlung der $LT_1$ und $LT_2$**

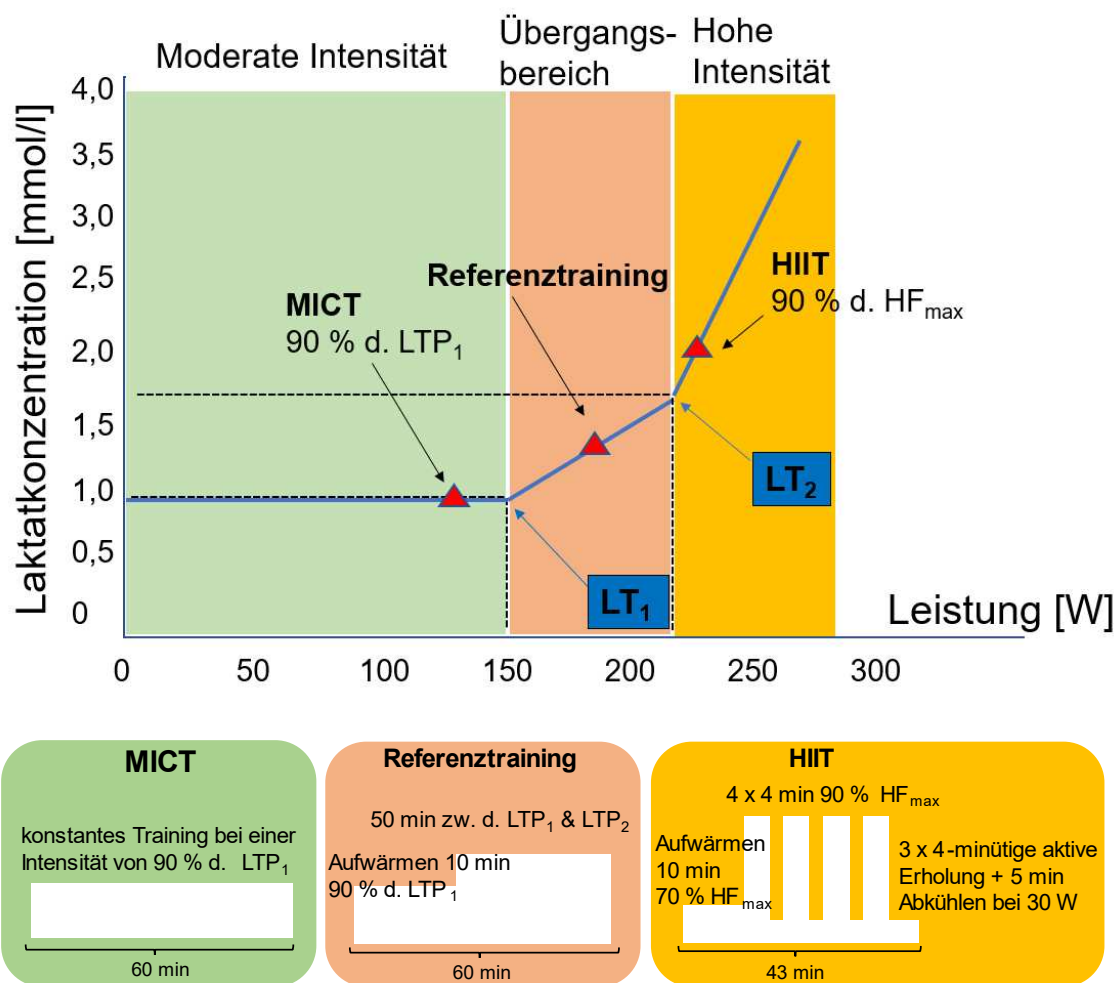
Die Laktatkonzentration wurde amperometrisch ermittelt. Hierbei wandelt das Enzym Laktatoxidase das in der Blutprobe enthaltene Laktat in Pyruvat und  $H_2O_2$  um. Das  $H_2O_2$  wird durch eine angelegte Spannung oxidiert. Diese Oxidation

erzeugt einen messbaren Elektronenfluss, welcher proportional zur eingesetzten Laktatmenge ist (Roecker, 2013).

Die  $LT_1$  wurde definiert als der erste Anstieg der Laktatkurve über die gemessene Basislaktatkonzentration. Die  $LT_2$  wurde durch den zweiten, exponentiellen Anstieg der Laktatkurve markiert (Hofmann et al., 1997; Hofmann & Tschakert, 2017; Maturana et al., 2021; Morton et al., 1994) (s. Abbildung 7).

### **2.4.3 Trainingsintervention**

Die Testpersonen nahmen an einem standardisierten zwölfwöchigen Trainingsprogramm im Rahmen der iReAct-Studie teil (Thiel et al., 2020) (für detaillierte zeitliche Übersicht s. Abbildung 8). Hierfür wurden sie in zwei Gruppen randomisiert und starteten dementsprechend mit einem sechswöchigen moderat-intensiven kontinuierlichen Training (MICT) oder einem hochintensiven Intervalltraining (HIIT). Das Training umfasste drei Tage Ausdauertraining pro Woche auf dem Ergoselect 200 Fahrradergometer (Ergoline GmbH, Bitz, Deutschland). Während des MICTs trainierten die Probandinnen 60 min bei einer Leistung, die 90 % der an der  $LT_1$  erbrachten Leistung entsprach ( $LTP_1$ , englisch *lactat threshold power 1*) (s. Abbildung 7). Das HIIT umfasste ein zehnminütiges Aufwärmprogramm bei einer Leistung, die 70 % der  $HF_{max}$  entsprach, gefolgt von 4 x vierminütigen Intervallen bei einer Leistung entsprechend 90 % der  $HF_{max}$ . An das HIIT schloss sich eine 3 x vierminütige aktive Erholungsphase an, gefolgt von einer fünfminütigen Abkühlungsperiode, die jeweils bei einer Intensität von 30 W durchgeführt wurde (s. Abbildung 7). Nach Beendigung des ersten Übungsblocks wurde das Programm auf die jeweils andere Methode (HIIT respektive MICT) umgestellt, ohne eine dazwischen liegende *Washout*-Periode durchzuführen, so dass ein beabsichtigter Übertragungseffekt (englisch *Carryover*-Effekt) induziert wurde. Vor jedem Trainingsblock und nach Beendigung der gesamten Intervention fand ein sechzigminütiges Referenztraining statt, um die individuelle Reaktion auf eine akute Belastung zu untersuchen. Nach einer zehnminütigen Aufwärmphase bei einer Leistung von 90 % der  $LTP_1$ , trainierten die Probandinnen dabei für weitere 50 min bei einer kontinuierlichen Belastung, die am Mittelpunkt des Übergangsbereichs zwischen der  $LT_1$  und  $LT_2$  lag (s. Abbildung 7) (Maturana et al., 2021).

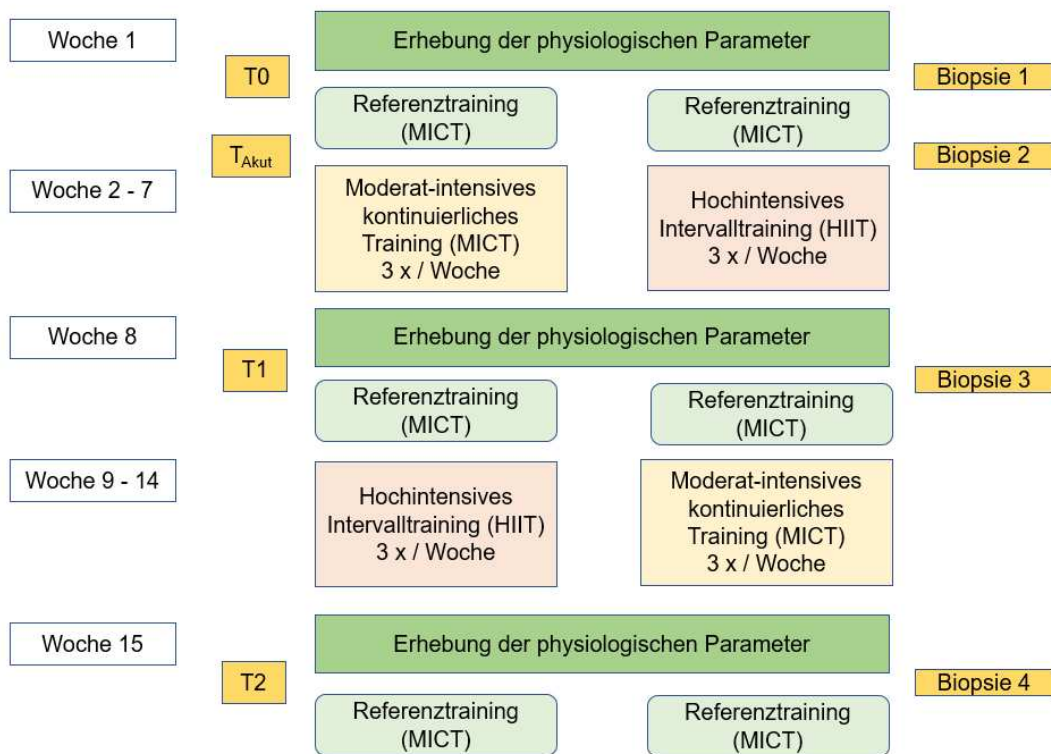


**Abbildung 7: Laktatschwellenkonzept und Übersicht über die einzelnen Trainingsprogramme.** In der oberen Graphik ist die Zunahme der Laktatkonzentration [mmol/l] auf der y-Achse in Abhängigkeit einer wachsenden Belastungsintensität [W], die auf der x-Achse aufgetragen ist, dargestellt. Der erste messbare Anstieg der Laktatkonzentration über den Basislaktatspiegel markiert die LT<sub>1</sub>. Der zweite, überproportionale Anstieg der Laktatkonzentration markiert die LT<sub>2</sub>. Das MICT wurde im Bereich der moderaten Intensität (grün), das Referenztraining im Übergangsbereich (rot) und das HIIT im Bereich der hohen Intensität (orange) durchgeführt. Die unteren Abbildungen skizzieren den Ablauf der verschiedenen Trainingsmodalitäten. LT<sub>1</sub> bzw. LT<sub>2</sub>: erste bzw. zweite Laktatschwelle (englisch *lactat threshold*); LTP<sub>1</sub> bzw. LTP<sub>2</sub>: erbrachte Leistung an der LT<sub>1</sub> bzw. LT<sub>2</sub> (englisch *lactat threshold power*); MICT: moderat-intensives kontinuierliches Training; HIIT: hochintensives Intervalltraining; HF<sub>max</sub>: maximale Herzfrequenz. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA) nach (Maturana et al., 2021).

#### 2.4.4 Probengewinnung

Im Rahmen der iReAct-Studie wurden den Teilnehmerinnen insgesamt vier Muskelbiopsien aus dem *Musculus vastus lateralis* von Mitarbeitenden der Abteilung für Sportmedizin des Universitätsklinikums Tübingen entnommen. Die

erste Muskelbiopsie wurde dabei im Ruhezustand einen Tag vor dem akuten Belastungstest gewonnen (T<sub>0</sub>), die zweite Biopsie zwei Stunden nach Beendigung des ersten Referenztrainings zur Untersuchung der Akutantwort in der Skelettmuskulatur (T<sub>Akut</sub>). Die dritte und vierte Biopsie wurde in Woche acht (T<sub>1</sub>) und 15 (T<sub>2</sub>) entnommen, jeweils 48 h nach der letzten Trainingseinheit, um das Risiko akuter Effekte zu minimieren (Thiel et al., 2020) (s. Abbildung 8). Die Muskelbiopsien wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren. Die Proben wurden in der Abteilung für Sportmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, gesammelt und aufbewahrt. Für die Fragestellung dieser Arbeit wurden die Biopsien, die zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> und T<sub>Akut</sub> gewonnen wurden, analysiert.



**Abbildung 8: Zeitplan und Studiendesign der iReAct-Studie.** Die iReAct-Studie umfasste ein insgesamt zwölfwöchiges Trainingsprogramm. Die Testpersonen starteten entweder mit einem moderat-intensiven kontinuierlichen Training oder einem hochintensiven Intervalltraining. Nach sechs Wochen Training wurde die Trainingsmodalität auf die jeweils andere Methode umgestellt. Vor Beginn des Trainingsprogramms sowie nach Beendigung jedes Trainingsblocks wurde ein sechzigminütiges Referenztraining durchgeführt. Die erste Skelettmuskelbiopsie wurde im Ruhezustand (T0), die zweite nach Beendigung des ersten Referenztrainings (T<sub>Akut</sub>), die dritte und vierte Biopsie 48 h nach Beendigung des ersten (T1) bzw. zweiten (T2) Trainingsblocks gewonnen. MICT: moderat-intensives Training; HIIT: hochintensives Intervalltraining. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA) nach (Thiel et al., 2020).

#### 2.4.5 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus den Biopsien, die zum Zeitpunkt T0 gewonnen worden waren, wurde durch Manuel Widmann (Abteilung Sportmedizin, Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt und die aufgereinigte RNA für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die RNA-Extraktion aus den „Akut“-Biopsien führte die Autorin dieser Arbeit selbst durch. Hierfür wurde die gesamte RNA, einschließlich kleiner RNA-Moleküle wie miRNAs, aus den Skelettmuskelproben mit dem miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die gefrorenen Biopsien wurden dabei aus dem flüssigen Stickstoff, in



welchem sie nach der Entnahme aus dem Ultra-Tiefkühlschrank transportiert wurden, unverzüglich in 2 ml *Precellys*-Röhrchen, befüllt mit Keramikkügelchen und 700 µl QIAzol Lysis Reagent, überführt, und bei 4000 rpm 2 x für 30 s homogenisiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei er jede Minute mittels Vibration durchmischt wurde. Die Zellüberreste wurden dann 3 min bei 4 °C und 10.000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 140 µl Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde kräftig für 15 s von Hand geschüttelt. Durch das Chloroform trennte sich die Lösung bei der anschließenden Zentrifugation (4 °C, 15 min, 12.000 x g) in eine untere Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere farblose wässrige Phase, welche die isolierte RNA enthielt. Diese Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die unteren Phasen unberührt blieben. 100%iges Ethanol, entsprechend dem 1,5fachen Volumen, wurde zu der isolierten Phase hinzugefügt und das gesamte Gemisch auf eine RNeasy MinElute spin column überführt. Nach Zentrifugation (20 °C, 15 s, 8000 x g) wurde die Probe nacheinander mit 700 µl Buffer RWT (20 °C, 15 s, 8000 x g), 500 µl Buffer RPE (20 °C, 15 s, 8000 x g) sowie 500 µl 80%igem Ethanol (20 °C, 2 min, 8000 x g) vom überschüssigen Chloroform gereinigt. Die RNeasy MinElute spin column wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 x g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurde sie in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. 20 µl RNase-freies Wasser wurden dann direkt auf das Säulchen pipettiert und nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch einminütige Zentrifugation (14.000 x g) eluiert. Nach der RNA-Isolierung wurde die RNA-Konzentration jeder Probe in einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Hierfür wurde 1 µl jeder Probe mit 99 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die Konzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten „Akut“-Proben lagen dabei zwischen 84 ng/µl und 371 ng/µl und die Konzentrationen der „T0“-Proben zwischen 54 ng/µl und 438 ng/µl. Durch Beurteilung der Verhältnisse der Extinktion bei 260 nm und 280 nm (260/280 *Ratio*) wurde die

Reinheit der Probe grob klassifiziert. Eine hohe Extinktion bei 280 nm gilt als Hinweis auf eine Verunreinigung mit Proteinen. Daher wurde als Reinheits- und Einschlusskriterium für diese Arbeit eine 260/280 *Ratio*  $\geq 1$  festgelegt. Nach der Analyse wurden die Proben auf 5 ng/ $\mu$ l mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -80 °C gelagert.

## **2.4.6 Mikroarray-Untersuchung**

### 2.4.6.1 Durchführung der Mikroarray-Experimente

Mikroarrays ermöglichen es, eine Vielzahl von Genen zeitgleich zu analysieren, wodurch keine Vorselektion der zu untersuchenden Basensequenzen nötig ist (Govindarajan et al., 2012). Das grundlegende Prinzip dieser Technologie basiert auf der Hybridisierung komplementärer Nukleinsäurestränge gemäß der Watson-Crick-Basenpaarung (Watson & Crick, 1953). Auf der Mikroarray-Oberfläche werden vorsynthetisierte Oligonukleotide mit definierter Sequenz in Form eines geordneten Gitters fixiert (Govindarajan et al., 2012). An diese binden die komplementären, mit Fluorophoren markierten Nukleinsäurestränge (cDNA- oder cRNA-Moleküle (englisch *complementary* DNA bzw. RNA) der zu analysierenden Probe. Ein Laserscanner regt die fluoreszierenden Farbstoffe an, und anhand der ausgestrahlten Intensität können Rückschlüsse auf die Quantität der analysierten Transkripte bzw. indirekt auf die Expression der entsprechenden Gene getroffen werden (Govindarajan et al., 2012; Wrulich & Überall, 2009). Die miRNA-Mikroarray-Analyse stellt einen umfassenden, unvoreingenommenen Ansatz dar, ist jedoch aufwändig und teuer, weshalb die Anzahl der Proben, die mit dieser Methode analysiert werden können, begrenzt ist (Wheelan et al., 2008). Vor diesem Hintergrund wurde für die hier beschriebene Analytik zunächst eine Gruppe von sechs weiblichen Testpersonen ausgewählt, die insbesondere in Bezug auf Alter (20 – 29 Jahre), *Body*-Maß-Index (BMI) ( $23,02 \pm 1,17 \text{ kg/m}^2$ ) und Ausgangs- $\dot{V}O_2\text{max}$  ( $31,7 \pm 1,16 \text{ ml/kg}\times\text{min}$ ) äußerst homogen war (s. Tabelle 7 und 9). Die miRNA-Expression wurde in diesen Proben mit der Affymetrix miR Array 4.0 Analyse (ATLAs Biolabs, Berlin, Deutschland) ermittelt. Die aufgereinigte RNA wurde hierfür mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l verdünnt und auf Trockeneis an ATLAs Biolabs

(Berlin, Deutschland) verschickt. Die Daten wurden anschließend mit der Transcriptome Analysis Console (TAC), Version 4.0.2.15 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), auf unterschiedliche miRNA-Muster hin untersucht. Basierend auf dem Format der Daten dieser *Software* wird in dieser Arbeit, wenn möglich, auf individuelle miRNAs unter Verwendung des vollständigen Namens verwiesen (beispielsweise „-5p“ oder „-3p“).

#### 2.4.6.2 Analyse der Mikroarray-Daten

Die miRNA-Expressionswerte werden in der TAC-*Software* im *Logarithmus dualis* angegeben. Die *Fold change* zwischen den beiden Zeitpunkten wird von der TAC-*Software* hingegen anhand der ursprünglichen, nicht-log(2)-Werte berechnet. Diese Darstellung der Ergebnisse ist somit missverständlich, da induzierte und reprimierte miRNAs unterschiedlich behandelt werden. Steigt die Expression einer miRNA durch die Intervention an ( $T_0 < T_{Akut}$ ), wird die „T<sub>0</sub>“-Probe als Ausgangswert betrachtet und die Änderung zu diesem Zeitpunkt beträgt definitionsgemäß 1. Die *Fold change* berechnet sich nach dem Dreisatz nachfolgender Formel:

$$\frac{1}{T_0} = \frac{x}{T_{Akut}} \rightarrow x = \frac{T_{Akut} * 1}{T_0} \quad (1)$$

Sinkt hingegen die miRNA-Expression ab ( $T_0 > T_{Akut}$ ), wird für die Berechnung der *Fold change* der negative Kehrwert gebildet, wodurch induzierte und reprimierte miRNAs symmetrisch betrachtet werden können. Andernfalls würden zum Beispiel miRNAs, die um den Faktor 2 induziert würden, ein Verhältnis von 2 aufweisen, miRNAs, die jedoch um denselben Faktor reprimiert würden (sprich halbiert würden), ein Verhältnis von 0,5. Durch Bildung des negativen Kehrwerts ergibt sich jedoch für diesen Fall eine *Fold change* von -2, wodurch die Dimension der Änderung anschaulicher widergespiegelt wird.

#### 2.4.7 Reverse Transkription

Für die Durchführung der qPCR mussten die RNA-Sequenzen zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Diese reverse Transkription wurde mit Hilfe des miRCURY LNA RT Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dieses beinhaltet den 10x miRCURY RT Enzyme Mix, welcher sowohl die Poly(A)-Polymerase als auch die reverse Transkriptase enthält, sowie den 5x miRCURY

SYBR Green RT Reaction Buffer, der die Oligo-dT-*Primer* enthält. Entsprechend der Probenanzahl wurde aus diesen Reagenzien, zusammen mit RNase-freiem Wasser und dem UniSp6 RNA *spike-in*, ein Mastermix vorbereitet, welcher in 0,2 µl PCR-Mikroreaktionsgefäße vorgelegt wurde. Anschließend wurden 20 ng (5 ng/µl) der aufgereinigten RNA hinzugefügt, sodass sich pro Ansatz ein Reaktionsvolumen von 20 µl ergab (entspricht einem doppelten Ansatz):

<b>5x miRCURY SYBR Green RT Reaction Buffer</b>	4 µl
RNase-freies Wasser	9 µl
<b>10x miRCURY RT Enzyme Mix</b>	2 µl
<b>miRCURY UniSp6 RNA Spike-In</b>	1 µl
Ziel-RNA (5 ng/µl)	4 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Alle Reagenzien und Proben wurden stets auf Eis gelagert, um eine Degradation der RNA zu vermeiden.

Die Reverse Transkription wurde mit dem iCycler Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) mit folgendem Temperatur-Zeit-Protokoll durchgeführt:

Reverse Transkription	60 min	42 °C
Inaktivierung der Reaktion	5 min	95 °C
Kühlung	unendlich	4 °C

Im Anschluss wurde die cDNA mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt und in 60 µl-Aliquoten bei -20 °C eingefroren.

## **2.4.8 Durchführung der qPCR-Experimente**

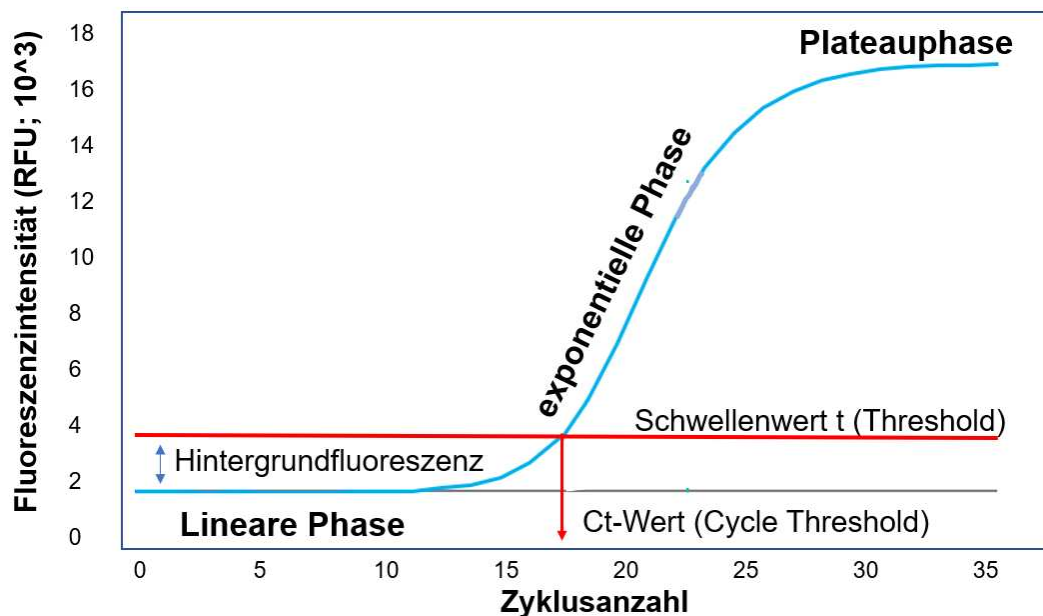
### 2.4.8.1 Grundlagen

Die qPCR, auch *Real-Time* PCR genannt, ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die auf den Prinzipien der konventionellen PCR basiert (Wang et al., 1989). Hierbei werden kleine Mengen doppelsträngiger DNA (dsDNA) *in vitro* durch sich zyklisch wiederholende Reaktionen exponentiell amplifiziert, wodurch die Quantifizierung der Zielsequenz ermöglicht wird

(Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013). Im Gegensatz zur konventionellen PCR bietet die qPCR den Vorteil, dass PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung während des PCR-Prozesses in Echtzeit („*Real-Time*“) erfolgen und nicht erst mittels Gelelektrophorese nach Abschluss der PCR durchgeführt werden müssen (Higuchi et al., 1993). Hieraus resultiert ein deutliches Zeitersparnis und das Kontaminationsrisiko ist geringer (Heid et al., 1996). Ein PCR-Zyklus setzt sich aus drei Phasen zusammen: Im ersten Schritt werden die doppelsträngigen Nukleinsäureketten bei 95 °C denaturiert. In einem zweiten Schritt lagern sich die Oligonukleotid-*Primer* bei 45 °C – 60 °C an das 3'-Ende ihrer komplementären Zielsequenz an (englisch *annealing*) (Delidow et al., 1993; Mackay et al., 2002). Bei diesen Temperaturen wird eine Hybridisierung der DNA-Stränge untereinander vermieden, da diese sich auf Grund ihrer Länge erst bei niedrigeren Temperaturen aneinanderlagern (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013). Durch die hitzestabile Taq-Polymerase kommt es im dritten Schritt bei 72 °C zur Synthese des zur Matrize komplementären DNA-Strangs (Elongation) (Saiki Randall et al., 1988). Bei der zweistufigen *Cycling*-Methode, die in dieser Arbeit angewandt wurde, wird die Anlagerung der Oligonukleotid-*Primer* und die anschließende Elongation der DNA-Stränge im Bereich der *Annealing*-Temperatur in einer Phase durchgeführt (Hawkins & Guest, 2017). Die Anzahl der DNA-Stränge steigt in jedem Zyklus exponentiell an, da der neusynthetisierte Strang wiederum als Matrize dient. Dieser Anstieg wird in der qPCR über fluoreszierende Farbstoffe (beispielsweise SYBR Green I, das in dieser Arbeit angewandt wurde) oder über sequenzspezifische Fluorophor-markierte DNA-Sonden detektiert (Navarro et al., 2015). SYBR Green I ist ein nicht-gekoppelter asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der unspezifisch an dsDNA bindet und im gebundenen Zustand bei ca. 520 nm fluoresziert (Navarro et al., 2015). Das Fluoreszenzsignal wird am Ende jedes Elongationsschrittes gemessen, wobei die Intensität mit der PCR-Produktkonzentration korreliert. Die resultierende Amplifikationskurve zeigt typischerweise einen sigmoiden Verlauf: Während der anfänglichen Amplifikationsphase ist die Produktkonzentration und somit das Fluoreszenzsignal unterhalb der Nachweisgrenze. Die Kurve zeigt eine Steigung von null (= *Baseline*). In dieser Phase wird die Stärke der Hintergrundfluoreszenz

berechnet (Wang et al., 2006; Wong & Medrano, 2005). Nach Eintritt in den detektierbaren Bereich wird ein exponentieller Anstieg der Kurve sichtbar. In dieser Phase herrschen optimale Amplifikationsbedingungen, so dass in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung des PCR-Produkts registriert werden kann. Im weiteren Verlauf der Reaktion werden zunehmend Reaktionsprodukte verbraucht, wodurch sich die Reaktion verlangsamt. Die Amplifikationskurve flacht ab und tritt in die Plateauphase über (Bustin, 2000; Wang et al., 2006; Wong & Medrano, 2005) (s. Abbildung 9).

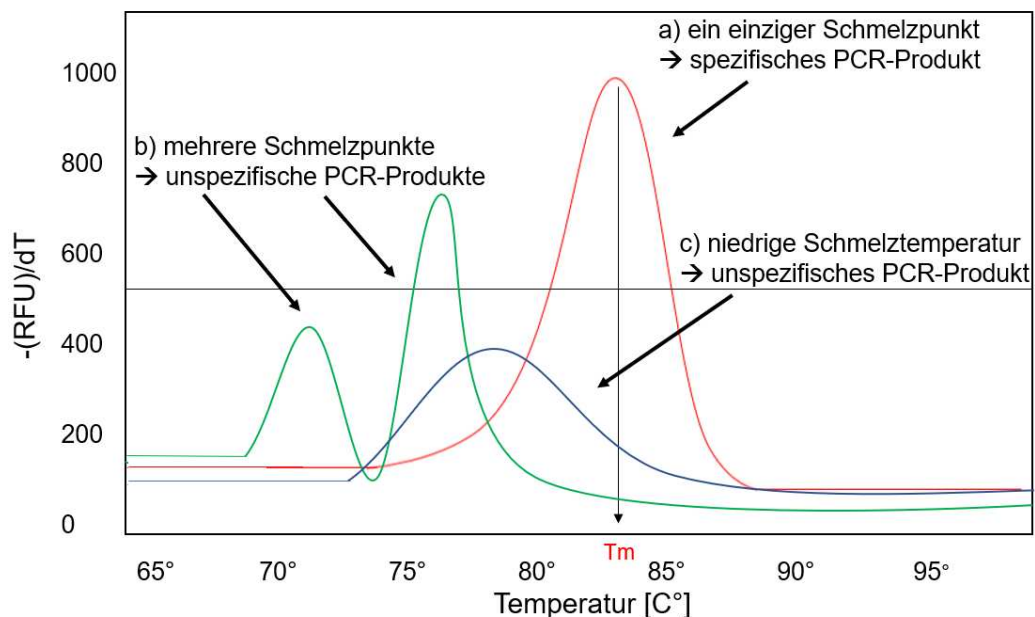
Der Schwellenwert  $t$  (englisch *Threshold*) entspricht dem Wert, an dem die Fluoreszenzintensität der PCR-Produkte erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser Wert ist für alle Proben konstant und wird in der frühen exponentiellen Phase festgelegt. Er dient zur Bestimmung des Zyklus-schwellenwerts ( $C_t$ ; *Cycle Threshold*), der für die Berechnung der relativen Quantität der Zielsequenz nötig ist (Heid et al., 1996). Dieser  $C_t$ -Wert markiert die Zykluszahl, bei welcher der Schwellenwert  $t$  überschritten wird und ist umgekehrt proportional zu der enthaltenen DNA-Menge der Probe. Je höher der Ausgangswert der Ziel-DNA ist, desto schneller akkumuliert genügend PCR-Produkt, um den Schwellenwert  $t$  zu überschreiten. Es resultiert ein niedriger  $C_t$ -Wert (Heid et al., 1996; Higuchi et al., 1993).



**Abbildung 9: Phasen einer qPCR-Amplifikationskurve.** Phase 1: lineare Phase - kein Anstieg der Fluoreszenz messbar. Berechnung der Hintergrundfluoreszenz. Phase 2: exponentielle Phase – es herrschen optimale Reaktionsbedingungen. Berechnung des Ct-Werts anhand des Schwellenwerts  $t$ . Phase 3: Plateauphase – Abflachung der Kurve durch Verbrauch der Reaktionssubstrate. RFU: relative Fluoreszenzintensität. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Das Fluorophor SYBR Green I weist eine geringe Spezifität auf, da es sich an alle dsDNA-Moleküle anlagert (Thornton & Basu, 2015). Somit bindet es nicht nur an die Ziel-DNA, sondern auch an *Primer*-Dimere und nicht-spezifische PCR-Produkte. Eine Differenzierung kann anhand einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen (Ririe et al., 1997). Hierbei wird nach Abschluss der Amplifikation die Temperatur schrittweise auf 95 °C erhöht. Dies führt zur Denaturierung der dsDNA-Moleküle. Der eingelagerte Farbstoff SYBR Green I wird bei der Denaturierung freigegeben, wodurch es zu einem steilen Abfall des Fluoreszenzsignals kommt. Dieser Schmelzpunkt ist abhängig von der Länge und dem Guanin-Cytosin- (GC-)Gehalt der dsDNA-Sequenz und daher charakteristisch für das entsprechende DNA-Molekül (Ririe et al., 1997). Herrschen optimale Bedingungen in der qPCR-Untersuchung, ist daher nur ein Scheitelpunkt im Fluoreszenzsignal der Schmelzkurve detektierbar. Amplifikationsartefakte denaturieren bei niedrigeren Temperaturen und weisen häufig mehrere Schmelzpunkte auf. Dies ermöglicht die Unterscheidung

zwischen spezifischen und nicht-spezifischen PCR-Produkten (Ririe et al., 1997) (s. Abbildung 10).

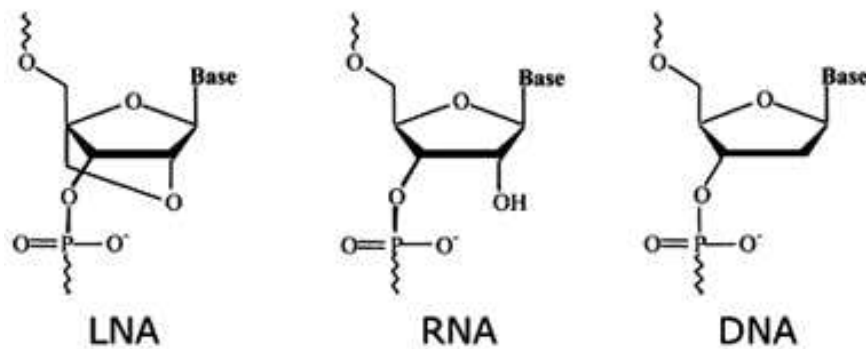


**Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse.** a) Schmelzkurve eines qPCR-Experiments unter optimalen Bedingungen (rot). Das spezifische PCR-Produkt weist einen charakteristischen Schmelzpunkt auf. b) Nicht-spezifische PCR-Produkte (bspw. *Primer-Dimere*) zeigen häufig mehrere Schmelzpunkte (grün). c) Ein nicht-spezifisches PCR-Produkt denaturiert bereits bei niedrigeren Temperaturen (blau). RFU: relative Fluoreszenzintensität;  $T_m$ : charakteristische Schmelztemperatur des spezifischen PCR-Produkts. Erstellt mit Microsoft PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

#### 2.4.8.2 Protokoll der LNA-qPCR

Die Bestimmung der miRNA-Quantität mittels qPCR wurde in dieser Arbeit unter Verwendung des miRCURY LNA miRNA PCR Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. LNAs stellen eine neue Klasse an RNA-Nukleinsäure-Analoga dar, in denen das Sauerstoffatom am C-2' der Ribose über eine Methylenbrücke mit dem 4'-Kohlenstoffatom verbunden ist (s. Abbildung 11). Dadurch wird die modifizierte Base in der 3'-Endo-Konformation gehalten, woraus eine stark eingeschränkte Konformationsfreiheit resultiert (Koshkin, Singh, et al., 1998).





**Abbildung 11: Vergleich der Struktur eines LNA-, eines RNA- und eines DNA-Nukleotids.** Im Gegensatz zu den RNA- und DNA-Nukleotiden ist bei den LNA-Molekülen das Sauerstoffatom an C-2' der Ribose über eine Methylenbrücke mit dem 4'-Kohlenstoffatom verbunden. Dies führt zur Bildung einer 3'-Endo-Konformation (links). RNA-Nukleotide weisen eine 2'-OH-Gruppe auf (mittig), welche in DNA-Nukleotiden durch ein Wasserstoffatom ersetzt wird (rechts). LNA: *locked nucleic acid*; RNA: Ribonukleinsäure; DNA: Desoxyribonukleinsäure. Übernommen aus (Silaharoglu et al., 2004).

Die qPCR-Primer (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden gemäß den Instruktionen des Herstellers zunächst in 220 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Es wurde ein Mastermix, bestehend aus dem 2x miRCURY SYBR Green Master Mix sowie den entsprechenden qPCR-Primern, hergestellt. Die Menge an einzusetzenden Reagenzien wurde routinemäßig mit einem 10%ig größeren Volumen als für die gesamte Probenanzahl benötigt angesetzt, um Verluste durch Adsorption und Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. Für eine PCR-Platte mit einer Kapazität von 96 Proben ergaben sich somit folgende Volumina:

<b>2x miRCURY LNA SYBR Green Master Mix</b>	525 µl
qPCR-Primerlösung (Konz.)	105 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>630 µl</b>

Der 2x miRCURY SYBR Green Master Mix, die qPCR-Primer sowie der hergestellte Mastermix wurden stets auf Eis gelagert, um eine Denaturierung zu vermeiden.

Nach Fertigstellung des Mastermix wurde dieser durch Vibration durchmischt und abzentrifugiert. Anschließend wurden 6 µl des Mastermix in die Vertiefungen der

qPCR-Platte (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) vorgelegt. Gemäß einem definierten Schema wurden je 4 µl der Ziel-cDNA hinzugegeben, so dass sich pro Probe ein Gesamtvolumen von 10 µl ergab. Hierbei wurde die Pipettenspitze nach jedem Schritt gewechselt, damit die Proben nicht vermischt oder verunreinigt wurden. Alle Proben wurden als Dupletts ausgewertet und in jedem qPCR-Durchlauf wurde eine Kontroll-Probe mitanalysiert. Hierbei wurden anstelle der Ziel-cDNA 4 µl Nuklease-freies Wasser zu dem vorgelegten Mastermix hinzugefügt („*No-Template*“-Probe). Die qPCR-Platte wurde anschließend mit einer Versiegelungsfolie (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) verschlossen, um ein Verdampfen des Reaktionsgemischs im Thermozykler zu verhindern. Alle Platten wurden mit dem CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) analysiert und durchliefen folgendes Temperaturprofil:

Polymerase-Aktivierung	2 min	95 °C
Denaturierung	10 s	95 °C
Annealing/Elongation	60 s	56 °C
Anzahl Zyklen	40	
Schmelzkurvenanalyse		60 - 95 °C

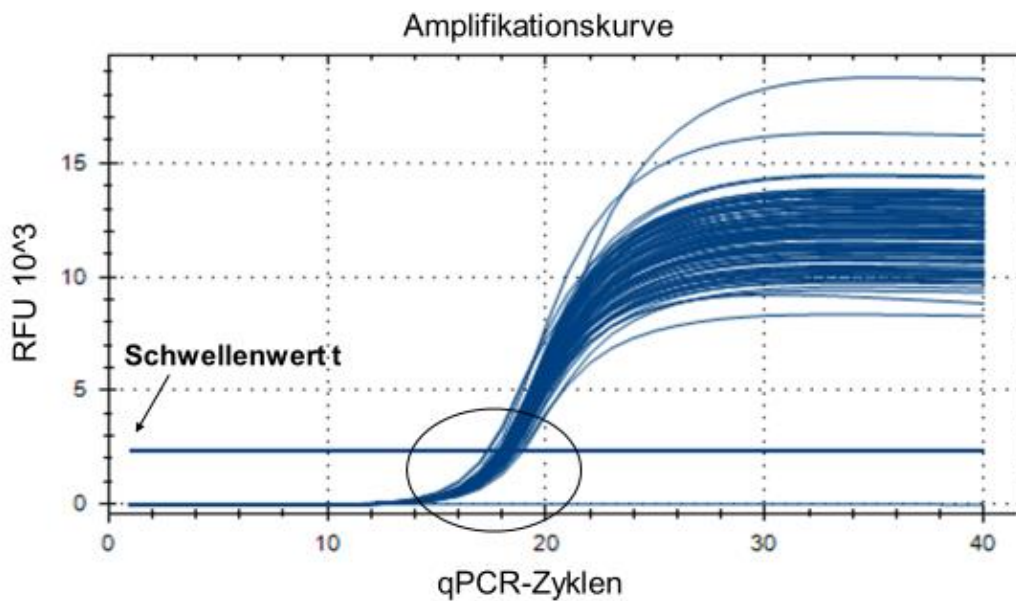
Die Fluoreszenz der Proben (SYBR Green I) wurde während dieser Zyklen in der Phase der Hybridisierung/Strangsynthese durchgehend gemessen. Für die anschließende Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben von 60 °C auf 95 °C erhitzt und die Fluoreszenz dabei kontinuierlich gemessen. Die Fluoreszenz jeder Probe wurde somit während der Amplifikation bezogen auf die Zyklen und während der Schmelzkurvenanalyse bezogen auf die Temperatur aufgezeichnet.

#### **2.4.9 Bestimmung der Effizienz der reversen Transkription und der qPCR-Amplifikation**

Mit Hilfe des miRCURY RNA Spike-In Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde unter Verwendung des UniSp6 RNA-Transkripts die Effizienz der reversen Transkription und der qPCR-Amplifikation überprüft. Dies ist sinnvoll, da es trotz optimaler Versuchsbedingungen bei der Isolierung von RNA aus Gewebe dazu

kommen kann, dass Inhibitoren der cDNA-Synthese bzw. der qPCR in der Probe enthalten bleiben (Bustin & Nolan, 2004). Vor Gebrauch wurde das UniSp6 RNA-Transkript gemäß den Instruktionen des Herstellers in 80 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde 20 – 30 min auf Eis inkubiert, damit sich das RNA-Transkript vollständig lösen konnte und wurde anschließend in Aliquoten bei -20 °C eingefroren.

Zur Überprüfung der Effizienz der cDNA-Synthese bzw. der qPCR-Amplifikation wurde eine definierte Menge des UniSp6 RNA-Transkripts (1 µl pro 20 µl Reaktionsgemisch) dem Mastermix für die reverse Transkription hinzugefügt (s. Kapitel 2.4.7). Die qPCR wurde nach dem unter Kapitel 2.4.8.2 beschriebenen Protokoll unter Verwendung des UniSp6-spezifischen *Primers* (*Gene Globe*: YP00203954; Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. In der anschließenden Analyse wurden die entsprechenden Ct-Werte aller Proben miteinander verglichen, um mögliche Ausreißer zu identifizieren und diese gegebenenfalls aus den folgenden qPCR-Experimenten auszuschließen. Alle in dieser Arbeit generierten cDNA-Proben zeigten jedoch vergleichbare Ct-Werte in der qPCR-Amplifikationskurve. Die Variationsbreite der Ct-Werte lag dabei zwischen 17,26 und 18,97 mit einer SD von  $\pm 0,25$  (s. Abbildung 12). Daraus lässt sich ableiten, dass alle cDNA-Umschriebe mit ähnlicher Effizienz durchgeführt wurden. Signifikante Differenzen in den Ct-Werten verschiedener Proben hätten dagegen auf einen Unterschied in der Effizienz der reversen Transkription und/oder qPCR-Amplifikation hingedeutet.



**Abbildung 12: Amplifikationskurve des UniSp6 RNA-Transkripts.** Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenzintensität (RFU), auf der x-Achse die Anzahl der qPCR-Zyklen aufgetragen. Das Diagramm wurde mit dem Programm CFX Manager Version 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) erstellt. Der Schwellenwert  $t$  wurde durch die CFX Manager-Software berechnet und festgelegt.

#### 2.4.10 Auswertung und Darstellung der qPCR-Ergebnisse

##### 2.4.10.1 Grundlagen der *delta-delta*-Ct-Methode

Die beiden am häufigsten verwendeten Methoden zur Analyse der qPCR-Daten ist die absolute und relative Quantifizierung (Pfaffl, 2004). Bei der absoluten Quantifizierung wird die eingesetzte Kopienzahl der zu untersuchenden Nukleinsäure bestimmt, indem der ermittelte Ct-Wert der Probe mit einer Standardkurve in Beziehung gesetzt wird (Wang et al., 1989). Bei der relativen Quantifizierung (in dieser Arbeit angewandt) wird die Veränderung der Expression des Zielgens der behandelten experimentellen Probe auf ein nicht behandeltes Kontrollmaterial bezogen. Die *Fold change* wird klassischerweise mit der *delta-delta*-Ct-Methode nach Livak und Schmittgen (2001) berechnet. Hierbei wird die Expression des Ziel-Gens ( $Ct_{\text{Zielgen}}$ ) mittels eines internen Referenzgens ( $Ct_{\text{Referenzgen}}$ ) normalisiert (2). In einem zweiten Schritt werden die normalisierten Expressionsunterschiede in der Behandlungs- und Kontrollgruppe voneinander subtrahiert (3) und in einem letzten Schritt wird die Potenz der

Differenz gebildet (4). Dies entspricht dem relativen Expressionsunterschied (R) zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe (Livak & Schmittgen, 2001):

$$\Delta Ct = Ct_{\text{(Zielgen)}} - Ct_{\text{(Referenzgen)}} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{(Behandlung)}} - \Delta Ct_{\text{(Kontrolle)}} \quad (3)$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (4)$$

Das gewonnene Ergebnis beschreibt also das Verhältnis des Zielgens zur Kontrollgruppe, normalisiert zur Expression des Referenzgens. Durch die Normalisierung kann die Varianz der Ergebnisse reduziert werden, da experimentelle Schwankungen gleichermaßen das Ziel- und Referenzgen betreffen (Bustin, 2000; Riedmaier, 2011).

#### 2.4.10.2 Bestimmung der relativen miRNA-Expression

Für die Bestimmung der relativen miRNA-Expression wurden die durch die CFX Manager-Software Version 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) festgelegten Ct-Werte jeder Amplifikationskurve analysiert. Zunächst wurde geprüft, ob die Ct-Werte eines Dupletts vergleichbare Werte aufwiesen. Dupletts, deren Einzelwerte > 1 Ct-Wert streuten, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen und das entsprechende qPCR-Experiment wiederholt. Für die anschließende Berechnung wurde die *delta-delta*-Ct-Methode modifiziert, um die relative Menge der zu untersuchenden cDNA-Spezies in den verschiedenen Proben zu ermitteln. Zunächst wurden die Ct-Werte der drei Referenz-miRNAs (SNORD49, SNORD48a und miR-423-3p) (s. Kapitel 3.2.2) jeder Probe zum geometrischen Mittel verrechnet ( $Ct_{\text{(GeomRef)}}$ ). Dieses wurde von dem Ct-Wert der untersuchten miRNA ( $Ct_{\text{(miRNA)}}$ ) subtrahiert (5) und anschließend der Mittelwert für jedes Duplett berechnet (6). Zum Schluss wurde die relative Expression (rel. Exp.) über die Potenz berechnet (7):

$$\Delta CT = Ct_{\text{(miRNA)}} - Ct_{\text{(GeomRef)}} \quad (5)$$

$$MW\Delta Ct = (\Delta CT_{\text{Probe1}} + \Delta CT_{\text{Probe2}}) / 2 \quad (6)$$

$$\text{Rel. Exp.} = 2^{-(MW\Delta Ct)} \quad (7)$$

Dieses Ergebnis beschreibt die einzelne miRNA-Expression zum Zeitpunkt T0 bzw. T<sub>Akut</sub> normalisiert zu der Expression der drei Referenz-miRNAs.

Die Berechnung der Veränderung der miRNA-Expression zwischen den beiden Zeitpunkten wurde analog zur Mikroarray-Analyse durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der beiden Methoden zu gewährleisten. Zunächst wurde die *Fold change* für jede Probe mit folgender Formel berechnet:

$$x = \frac{\text{Rel. Exp. (TAkut)}}{\text{Rel. Exp. (T0)}} \quad (8)$$

Bei einer *Fold change* < 1 wurde der negative Kehrwert gebildet.

#### **2.4.11 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse wurde mit IBM SPSS Statistics Version 27.0 (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Alle Tests waren zweiseitig und ein Schwellenwert von  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant (\*), ein Schwellenwert von  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant (\*\*) definiert. Die Daten wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet, da dieser eine größere Teststärke im Vergleich zu dem Kolmogorov-Smirnov-Test, insbesondere bei einem kleinen Stichprobenumfang, aufweist (Razali & Wah, 2011). Die Nullhypothese  $H_0$  hierbei besagt, dass die Daten normalverteilt sind. Ergibt sich ein  $p < 0,05$ , muss  $H_0$  verworfen werden und die Alternativhypothese, dass die Daten nicht normalverteilt sind, angenommen werden. Die Mittelwerte normalverteilter Daten wurden mit dem t-Test für abhängige Stichproben verglichen. Die Mittelwerte nicht-normalverteilter Daten wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen.

Korrelationen zwischen zwei kontinuierlichen Variablen wurden mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten  $r$  geprüft, da dieser gegenüber Ausreißern weniger sensitiv reagiert als der Pearson-Korrelationskoeffizient. Um die Stärke einer Korrelation zu interpretieren, kann man sich an den Richtlinien von Cohen (1988) orientieren. Nach dieser Einteilung entspricht ein Korrelationskoeffizient ab  $|r| = 0,1$  einer schwachen, ab  $|r| = 0,3$  einer moderaten und ab  $|r| = 0,5$  einer starken Korrelation. In der vorliegenden Arbeit wurde der zu wählende Schwellenwert für  $r$  jedoch mit der frei verfügbaren *Software* G\*Power Version 3.1.9.7 (Faul et al., 2007) berechnet, welche eine Berechnung von  $r$  in Abhängigkeit des Stichprobenumfangs  $n$  erlaubt. Es wurden folgende Kriterien gesetzt: Test family: Exact; Statistical Test: Correlation: Bivariate normal model;

Type of power analysis: Sensitivity- compute required effect size – given  $\alpha$ , power and sample size; Tails: One; Effect direction:  $r \geq \rho$ ;  $\alpha$  err prob = 0,05; power ( $1 - \beta$  err prob) = 0,95; Correlation  $\rho$   $H_0 = 0$ . Die Interpretation der Ergebnisse orientierte sich hierbei insbesondere bei den Analysen, für die nur wenige Datenpunkte zur Verfügung standen, primär an den errechneten r-Werten bzw. deren Relation zueinander und weniger an den absoluten Werten der Signifikanz. Daher wurde auf eine Korrektur des Signifikanzniveaus (wie zum Beispiel Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche) verzichtet.

Um die Frage zu beantworten, ob die Veränderung der miRNA-Expression einen potenziellen Prädiktor für die Vorhersage der individuellen Trainingsreaktion darstellen könnte, wurden die berechneten *Fold changes* mit der Veränderung der physiologischen Parameter nach dem ersten und zweiten Trainingsblock korreliert. Als wichtigster Trainingseffekt wurde die  $\Delta\dot{V}O_{2\max}$  angesehen. Als sekundärer Marker wurde die  $\Delta LTP_2$  analysiert.

Für die Überprüfung der Übereinstimmung der Mikroarray- und qPCR-Daten wurde das Konkordanz-Maß  $\gamma$  nach Goodman und Kruskal (1954) modifiziert angewandt. Das Vorzeichen der Änderungsrichtung einer miRNA wurde zunächst zwischen beiden Methoden in den einzelnen Probandinnen verglichen. Ein konkordantes Paar weist hierbei definitionsgemäß bei beiden Analysetechniken dieselbe Regulationsrichtung (Induktion/Repression) auf, ein diskordantes Paar hingegen eine gegensätzliche Regulation. Anhand der Anzahl der konkordanten (K) und diskordanten (D) Paare je miRNA errechnet sich dann  $\gamma$  nachfolgender Formel:  $\gamma = (K - D) / (K + D)$ . Eine perfekte Konkordanz entspricht einem  $\gamma$  von +1, eine vollständige Diskordanz einem  $\gamma$  von -1.

Die statistischen Daten wurden mittels Microsoft Excel 2019 (Microsoft, Redmond, WA, USA) grafisch dargestellt. Box-Plots wurden mit IBM SPSS Statistics Version 27.0 (IBM, Armonk, NY, USA) erstellt.

#### **2.4.12 KEGG-Signalweganalyse**

Die KEGG- (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*-)Signalweganalyse wurde mit Hilfe der *Online*-Plattform DIANA-miRPath v3.0 durchgeführt (Vlachos et al., 2015). Bei dieser handelt es sich um eine Referenzdatenbank, die experimentell ermittelte miRNA-Gen-Interaktionen in verschiedenen Zelltypen,

Gewebe und unter verschiedenen Bedingungen bei zahlreichen Spezies anzeigt (Paraskevopoulou et al., 2016). In dieser Arbeit wurde der Algorithmus TarBase v7.0 zur Interpretation der funktionellen Rolle der miRNAs verwendet. Dieser katalogisiert tausende experimentell validierte miRNA-Zielgene und verknüpft diese mit detaillierten Metadaten (Vlachos et al., 2015). Zur Bestimmung der Signalwege, in die die analysierten miRNAs involviert sein könnten, wurde die Kategorie „*Pathway Union*“ mit folgenden Kriterien gewählt:  $p\text{-Wert} \leq 0,05$ , Fisher's Exact Test (hypergeometrische Verteilung) sowie Korrektur der Falscherkennungsrate (FDR *correction*).



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Mikroarray-Analyse

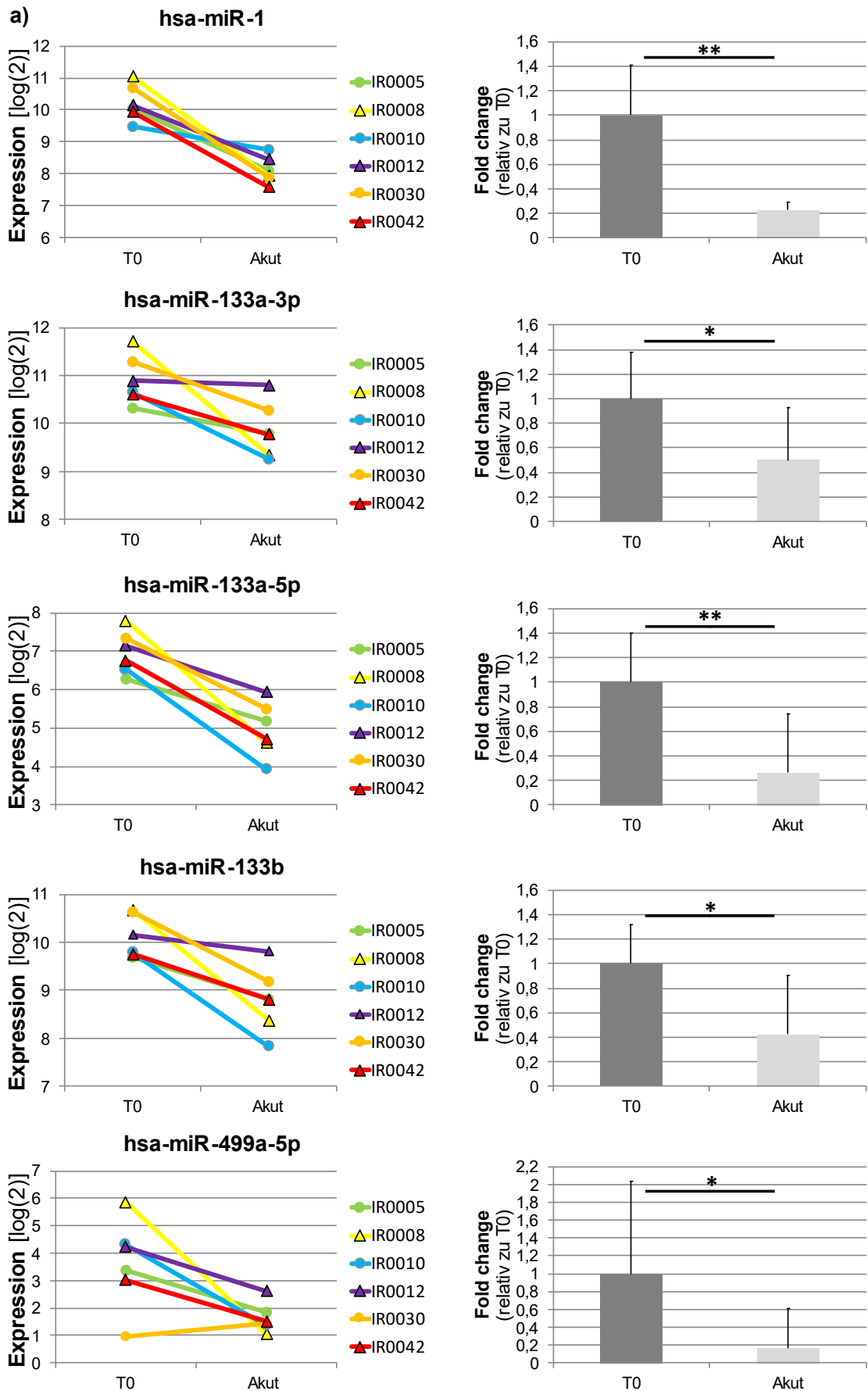
#### 3.1.1 Analyse der miRNA-Akutmuster im Kontext einschlägiger Literaturdaten

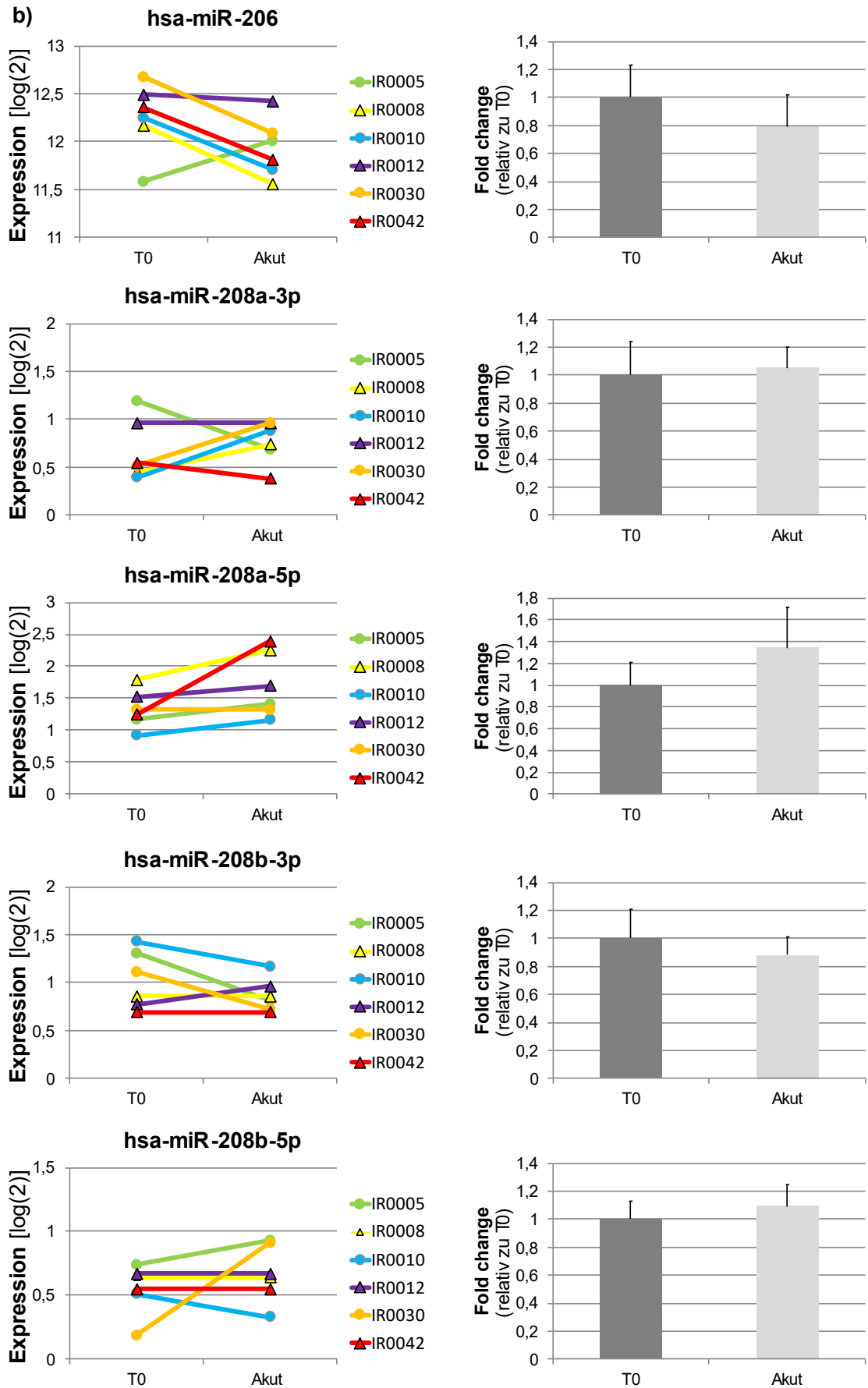
In einer Vielzahl an Studien wurde bereits die miRNA-Regulation bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur auf einen Belastungsreiz hin untersucht. Basierend auf diesen publizierten Erkenntnissen wurde in dieser Arbeit initial die Veränderung ausgewählter miRNAs ohne Festlegung eines minimalen Schwellenwerts, bezogen auf die *Fold change*, betrachtet. In der Literatur wird häufig nicht spezifiziert, ob die Daten der analysierten miRNAs sich auf die „-3p“- oder „-5p“-Spezies beziehen. In der Regel wird ohne Angaben der Strangdifferenzierung auf die „dominierende“ miRNA Bezug genommen (s. Kapitel 1.2.1). Wurde die miRNA-Spezies in den zitierten Studien nicht explizit angegeben, wird in dieser Arbeit die Hauptform, gemäß der miRNA-Datenbank miRBase Version 22 (Kozomara et al., 2018), in Klammer ergänzt, beispielsweise miR-9(-5p). In der hier vorliegenden Arbeit wurden beide miRNA-Stränge betrachtet, um ein allumfassendes Verständnis der miRNA-Regulation zu generieren. Darüber hinaus können unterschiedliche Vorläufersequenzen und genomische Loci identische reife Sequenzen kodieren. In diesen Fällen werden die reifen miRNA-Spezies nummeriert, beispielsweise miR-128a-1 und miR-128a-2. Entsprechende Informationen können der miRNA-Datenbank miRBase (Kozomara et al., 2018) entnommen werden.

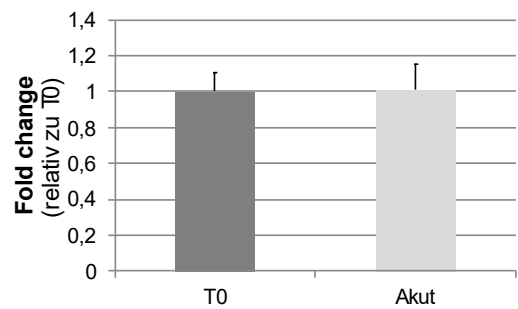
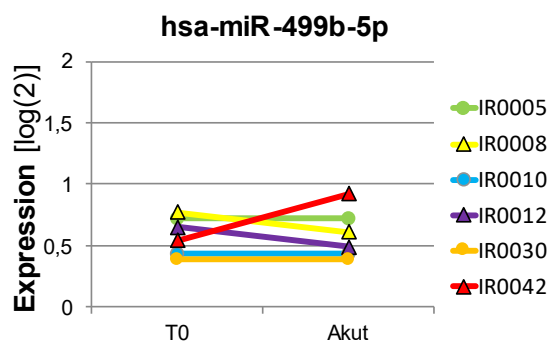
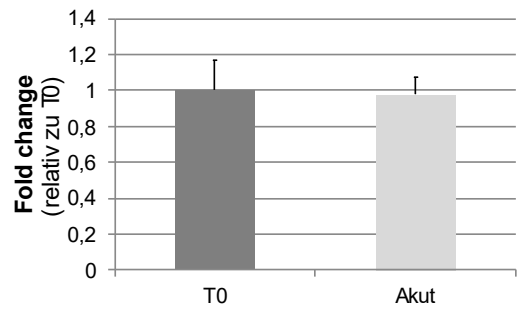
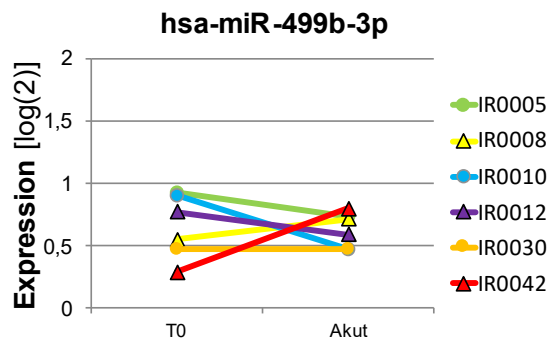
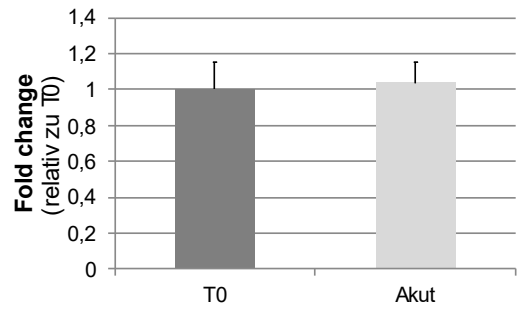
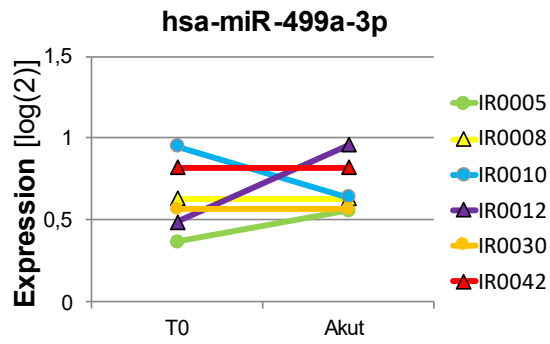
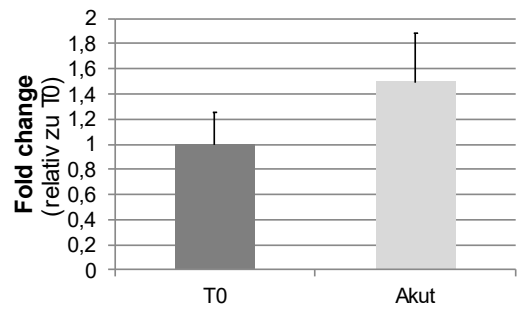
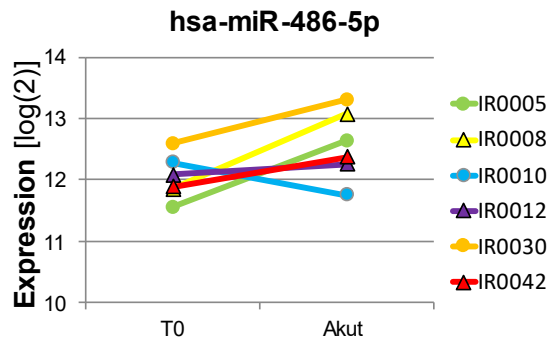
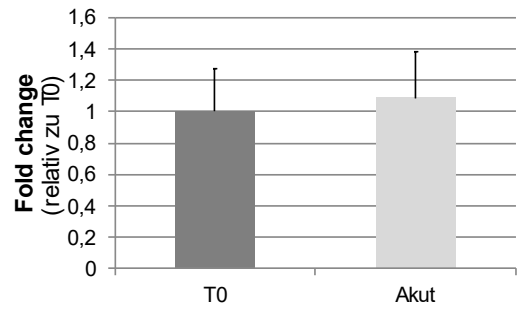
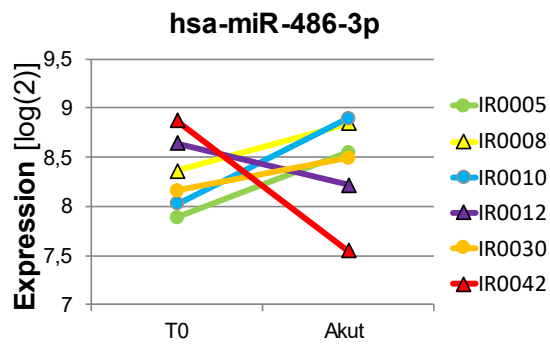
##### 3.1.1.1 Vergleich der Literaturdaten der myomiRs

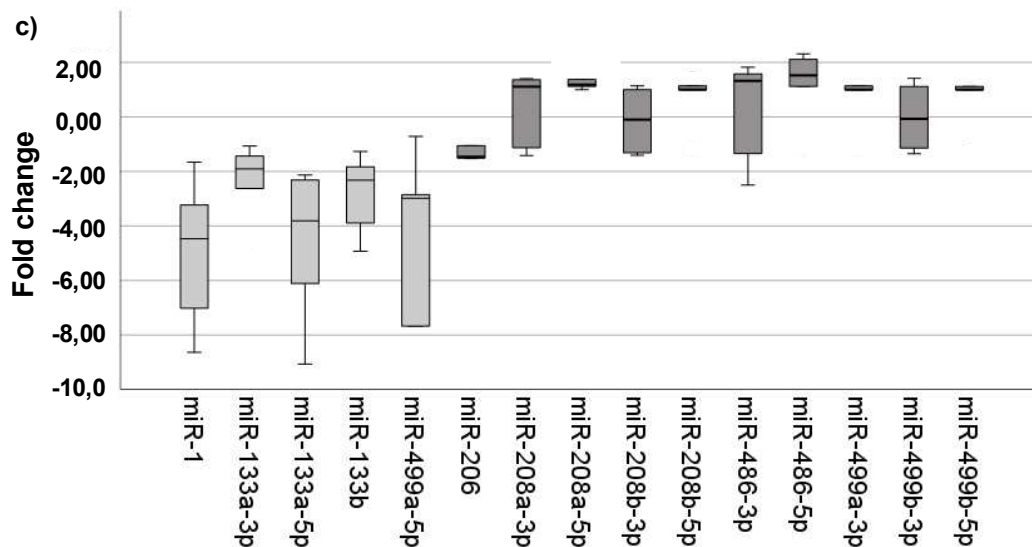
Zunächst wurde das Profil der muskelspezifischen miRNAs analysiert, zu denen vor Beginn dieser Arbeit bereits einige Literaturdaten im Kontext verschiedener Trainingsstudien existierten (D'Souza et al., 2017; Keller et al., 2011; Margolis et al., 2017; Nielsen et al., 2010; Ringholm et al., 2011; Rivas et al., 2014; Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009; Zacharewicz et al., 2014) (s. Kapitel 1.2.2). Hierbei konnten (hoch)signifikante Repressionen der myomiRs miR-1 (in der TAC-Software wird nicht zwischen miR-1-3p und miR-1-5p unterschieden), miR-133a-3p/-5p, miR-133b sowie miR-499a-5p in Antwort auf die Akutbelastung

nachgewiesen werden. Die errechneten *Fold changes* betragen dabei für miR-1: -4,91 ( $p = 0,008^{**}$ ), für miR-133a-5p: -4,54 ( $p = 0,006^{**}$ ) und für miR-499a-5p: -7,61 ( $p = 0,046^*$ ). Bei den beiden myomiRs miR-133a-3p und miR-133b war die Reduktion mit *Fold changes* von -2,34 ( $p = 0,041^*$ ) bzw. -2,76 ( $p = 0,011^*$ ) geringer (s. Abbildung 13a, c). Die weiteren myomiRs (miR-206, miR-208a/b, miR-486-3p, miR-499a-3p sowie miR-499b) wiesen nichtsignifikante Veränderungen kleiner Faktor 2 auf (s. Abbildung 13b, c) und wurden daher in den weiterführenden qPCR-Untersuchungen nicht berücksichtigt (s. Kapitel 3.2). Die *Fold changes* der verschiedenen myomiRs sind in Abbildung 13c in Box-Plots dargestellt, um die Veränderung der Expression dieser miRNAs vergleichend zu skizzieren. Für eine bessere Übersicht der Box-Plots sind Ausreißer und Extremwerte nicht abgebildet. Ausreißer und Extremwerte sind hierbei definiert als Werte, die mehr als den 1,5fachen bzw. 2,5fachen Interquartilabstand vom ersten oder dritten Quartil entfernt liegen.





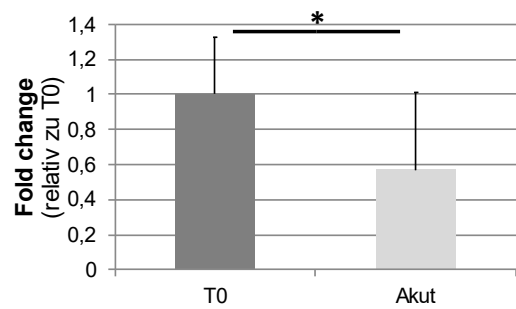
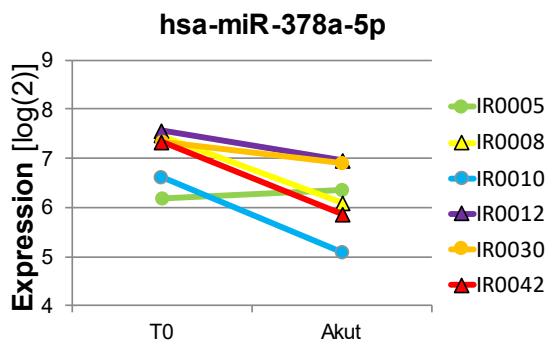
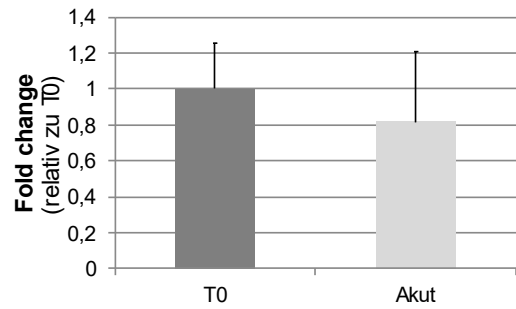
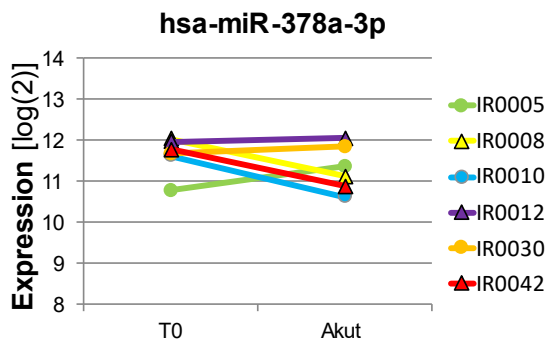
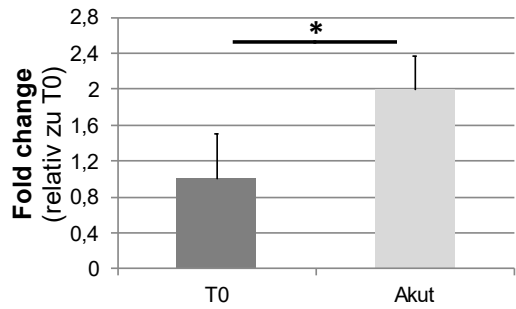
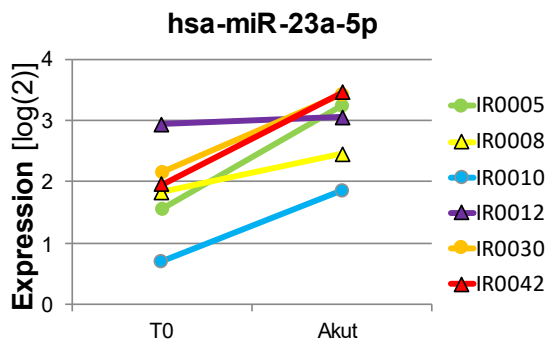
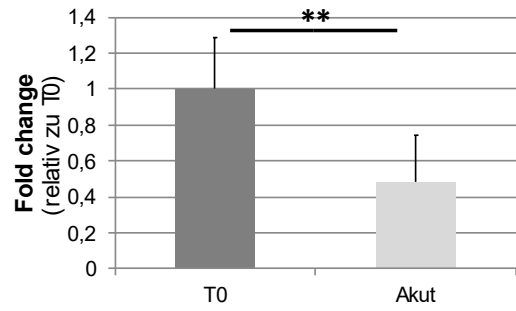
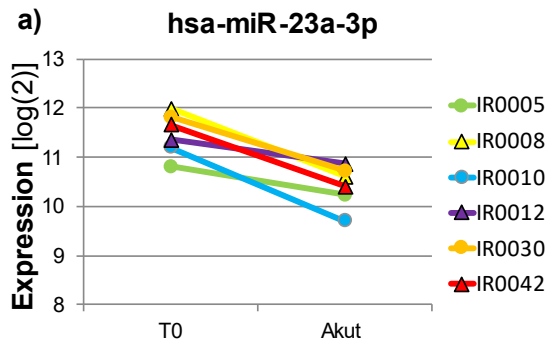




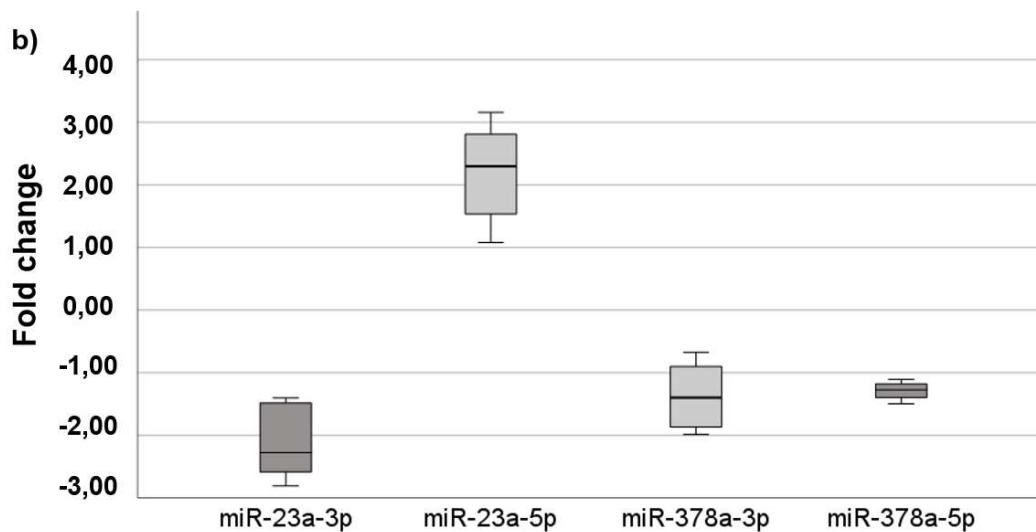
**Abbildung 13: Mikroarray-Daten der muskelspezifischen miRNAs.** a) und b) Linke Spalte: Veränderung der myomiR-Expression zwischen den Zeitpunkten T<sub>0</sub> und T<sub>Akut</sub> bei den einzelnen Probandinnen der Mikroarray-Analyse (n = 6). Die Werte sind im *Logarithmus dualis* aufgetragen. Rechte Spalte: Expression der miRNAs zum Zeitpunkt T<sub>Akut</sub> relativ zum Zeitpunkt T<sub>0</sub>. Kreise markieren Probandinnen, die im ersten Trainingsblock das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). Diese Unterscheidung wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3). IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; hsa-: *Homo sapiens*; T<sub>0</sub>: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten. a) myomiRs mit einer (hoch)signifikanten Veränderung. Es errechneten sich folgende *Fold changes*: miR-1: -4,91 (p = 0,008\*\*), miR-133a-3p: -4,54 (p = 0,041\*), miR-133a-5p: -4,54 (p = 0,006\*\*), miR-133b: -2,76 (p = 0,011\*), miR-499a-5p: -7,61 (p = 0,046\*). Diese miRNA-Spezies wurden in folgenden qPCR-Experimenten in einer größeren Kohorte (n = 29) weiterführend analysiert (s. Kapitel 3.2). b) MyomiRs ohne signifikante Regulation und einer *Fold change* kleiner Faktor 2. c) Übersicht über die *Fold changes* aller myomiRs der Mikroarray-Analyse. Hellgraue Box-Plots markieren myomiRs, die in nachfolgenden qPCR-Experimenten weiter getestet wurden. Ausreißer und Extremwerte sind nicht dargestellt.

### 3.1.1.2 Vergleich der Literaturdaten für miR-23a und miR-378a

Zusätzlich zu den myomiRs wurden die Muster von miR-23a sowie miR-378a analysiert, für die vor Beginn dieser Arbeit ebenfalls einschlägige Literaturdaten vorlagen: Nach einem akuten Ausdauertraining wurde eine Reduktion von miR-23a(-3p) von Russel et al. (2013), Safdar et al. (2009) und Ringholm et al. (2011) gemessen. McLean et al. (2015) postulierten eine Zunahme von miR-378a-5p. Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Mikroarray-Analyse eine gegensätzliche Regulation im Vergleich zu den bisher publizierten Ergebnissen, mit einer signifikanten Abnahme von miR-378a-5p (*Fold change*: -1,99;  $p = 0,018^*$ ) sowie einer nichtsignifikanten Repression von miR-378a-3p (*Fold change*: -1,37;  $p = 0,284$ ) in Antwort auf die Akutbelastung (s. Abbildung 14a, b). Des Weiteren fiel eine gegensätzliche Regulation der beiden miR-23a-Stränge mit einer hochsignifikanten Reduktion von miR-23a-3p (*Fold change*: -2,14;  $p = 0,004^{**}$ ), aber einer signifikanten Zunahme von miR-23a-5p (*Fold change*: 2,2;  $p = 0,017^*$ ) auf (s. Abbildung 14a, b). Die *Fold changes* sind für eine bessere Vergleichbarkeit der miRNAs untereinander in Abbildung 14b in Box-Plots dargestellt. Ausreißer sind wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, nicht abgebildet. Auf Grund der widersprüchlichen Daten zwischen den in dieser Arbeit detektierten und in der Literatur beschriebenen Ergebnissen für miR-378a-5p sowie der gegensätzlichen Regulation zwischen den beiden miR-23a-Spezies wurden die Akutmuster von miR-23a-5p sowie miR-378a-5p nachfolgend mittels qPCR in einer größeren Kohorte analysiert (s. Kapitel 3.2).



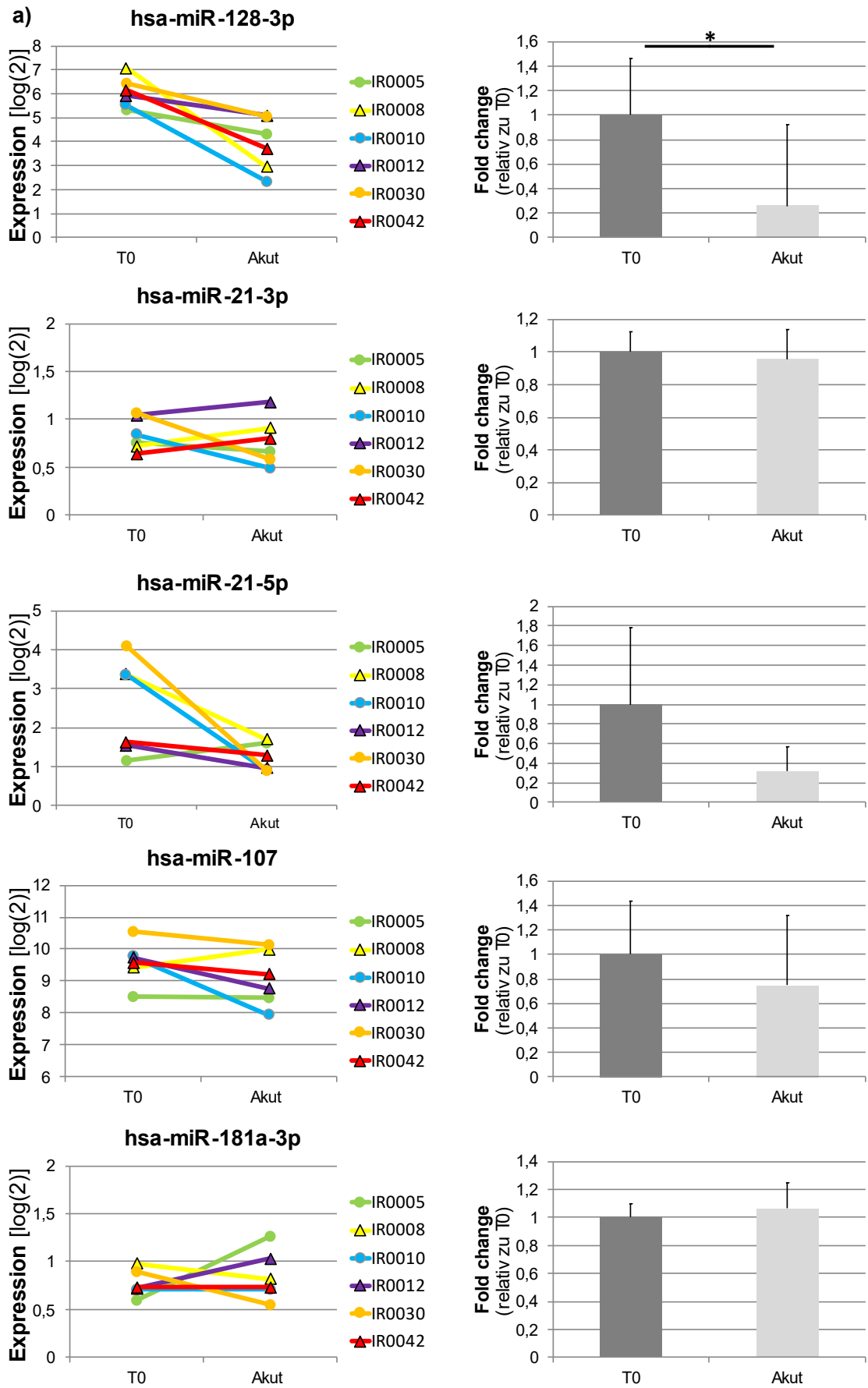


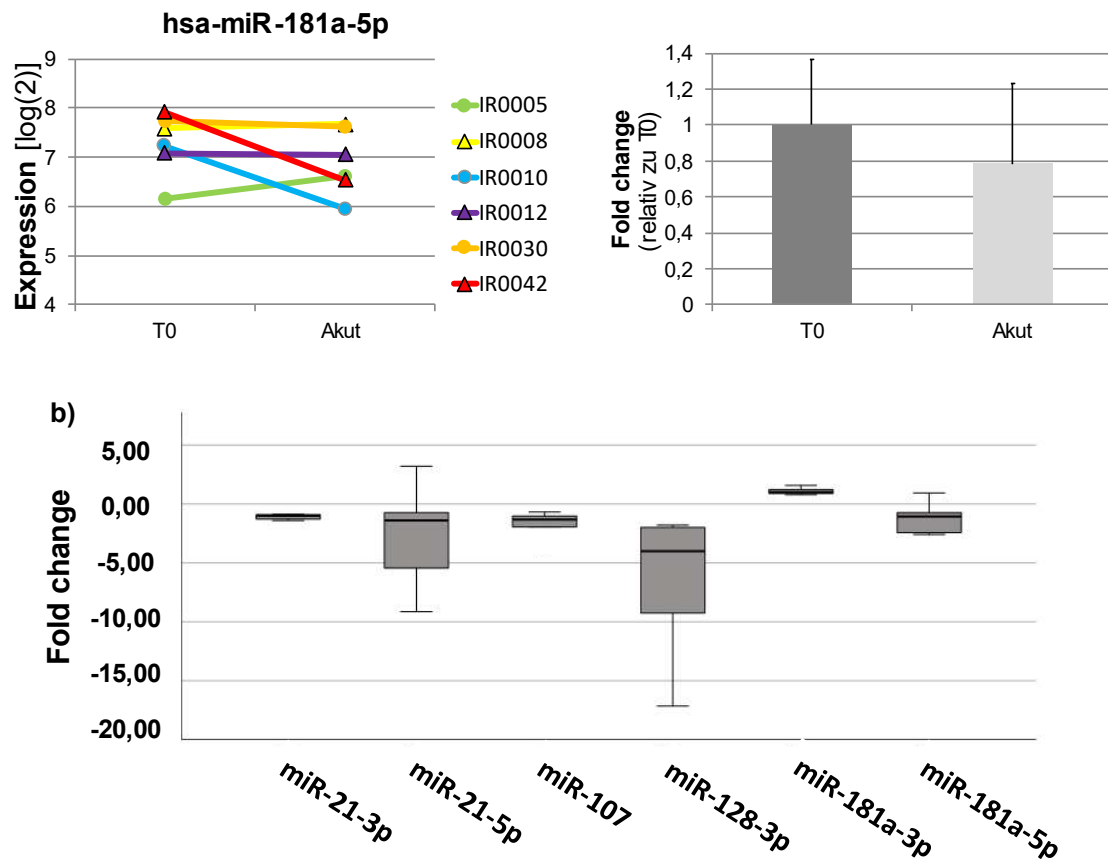


**Abbildung 14: Mikroarray-Daten für miR-23a und miR-378a.** a) Linke Spalte: Veränderung der miRNA-Expression von miR-23a-3p/-5p, und miR-378a-3p/-5p zwischen den Zeitpunkten T<sub>0</sub> und T<sub>Akut</sub> bei den einzelnen Probandinnen der Mikroarray-Analyse (n = 6). Die Werte sind im *Logarithmus dualis* aufgetragen. Rechte Spalte: Expression der miRNAs zum Zeitpunkt T<sub>Akut</sub> relativ zum Zeitpunkt T<sub>0</sub>. Es errechneten sich folgende *Fold changes*: miR-23a-3p: -2,14 (p = 0,004\*\*), miR-23a-5p: 2,2 (p = 0,017\*), miR-378a-3p: -1,37 (p = 0,284), miR-378a-5p: -1,99 (p = 0,018\*). Kreise markieren Probandinnen, die im ersten Trainingsblock das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). Diese Unterscheidung wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3). IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; hsa-: *Homo sapiens*; T<sub>0</sub>: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten. b) Übersicht zu den *Fold changes* von miR-23a-3p/-5p und miR-378a-3p/-5p. Hellgraue Box-Plots markieren miRNA-Spezies, die in folgenden qPCR-Experimenten weiter getestet wurden (s. Kapitel 3.2). Ausreißer und Extremwerte sind nicht dargestellt.

### 3.1.1.3 Vergleich der Literaturdaten für miR-21, miR-107, miR-128 und miR-181a

In vorangegangenen Studien war eine Zunahme von miR-21-5p, miR-107, miR-128(-3p) sowie miR-181a(-5p) bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur beschrieben worden (McGivney et al., 2017; McLean et al., 2015; Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009). Die Analyse dieser miRNAs zeigte innerhalb des dieser Arbeit zugrundeliegenden Datensatzes eine signifikante Reduktion von miR-128-3p (*Fold change*: -6,36;  $p = 0,018^*$ ) (s. Abbildung 15a, b), jedoch keine Veränderung von miR-128a-1-5p sowie miR-128a-2-5p (nicht dargestellt). Entgegen den bisherigen Studien zeigte sich zudem eine Reduktion von miR-21-5p (*Fold change*: -3,5;  $p = 0,091$ ), miR-107 (*Fold change*: -1,63;  $p = 0,191$ ) sowie miR-181a-5p (*Fold change*: -1,46;  $p = 0,25$ ) (s. Abbildung 15a, b). Diese Abnahme war jedoch nicht signifikant. Die Spezies miR-21-3p sowie miR-181a-3p wiesen hingegen keine belastungsinduzierte Veränderung auf (*Fold change*: -1,07 ( $p = 0,602$ ) bzw. 1,08 ( $p = 0,572$ )) (s. Abbildung 15a, b). Die *Fold changes* sind für eine bessere Vergleichbarkeit der miRNAs untereinander in Abbildung 15b in Box-Plots dargestellt. Ausreißer und Extremwerte sind wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, nicht abgebildet.

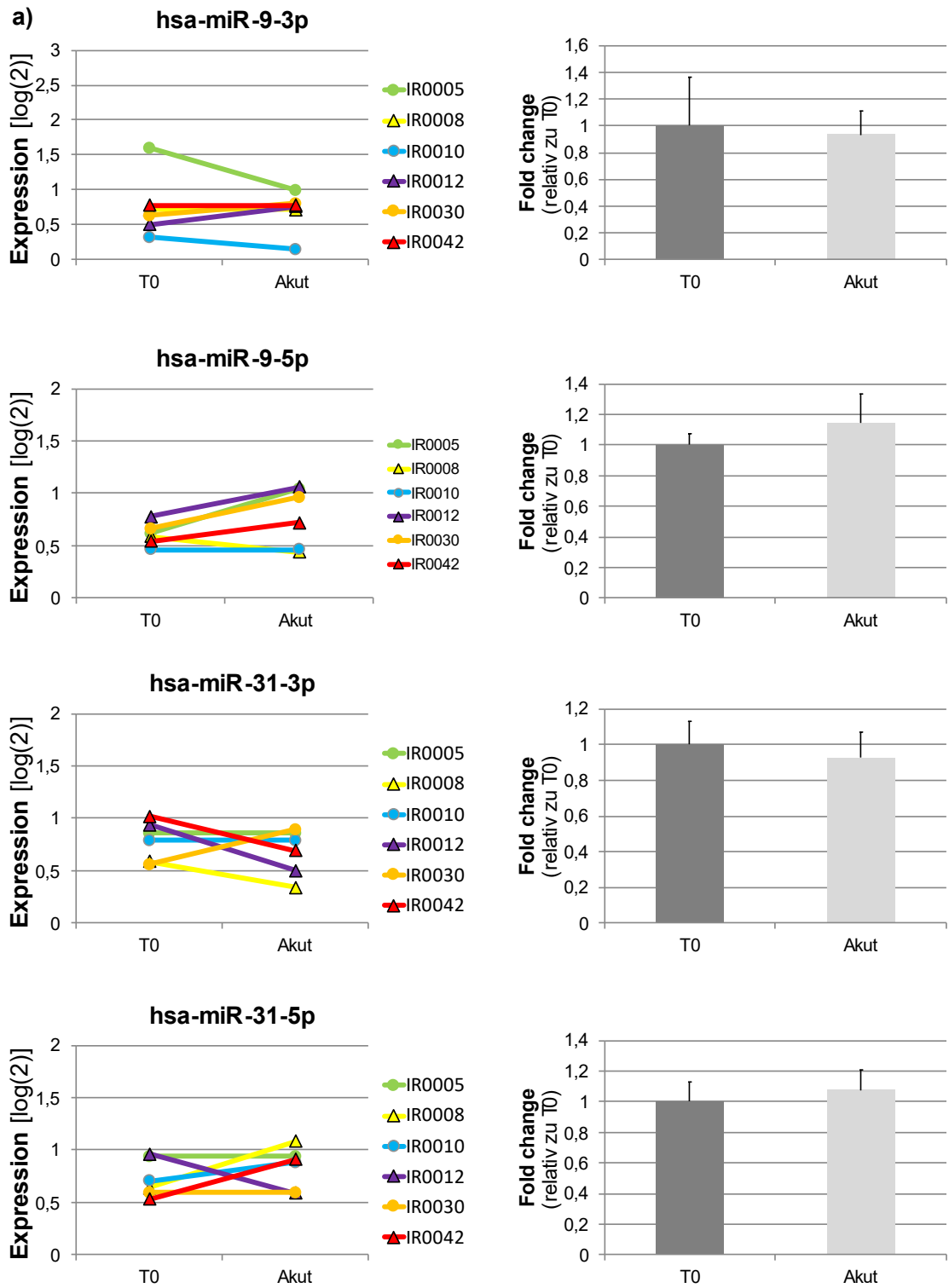


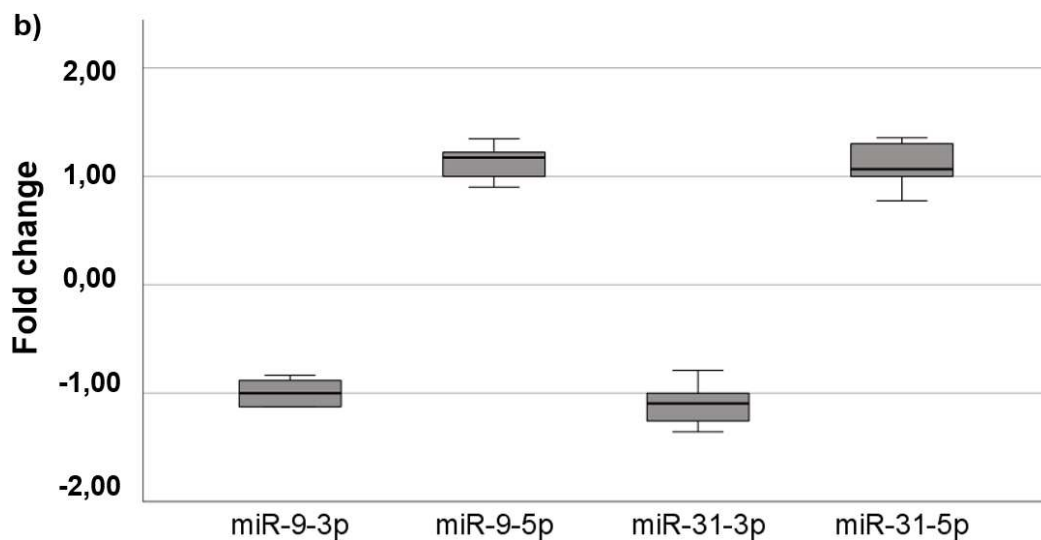


**Abbildung 15: Mikroarray-Daten für miR-21, miR-107, miR-128-3p und miR-181a.** a) Linke Spalte: Veränderung der miRNA-Expression zwischen den Zeitpunkten T0 und T<sub>Akut</sub> in den einzelnen Probandinnen der Mikroarray-Analyse (n = 6). Die Werte sind im *Logarithmus dualis* aufgetragen. Rechte Spalte: Expression der miRNAs zum Zeitpunkt T<sub>Akut</sub> relativ zum Zeitpunkt T0. Es errechneten sich folgende *Fold changes*: miR-128-3p: -6,36 (p = 0,018\*), miR-21-3p: -1,07 (p = 0,602), miR-21-5p: -3,5 (p = 0,091), miR-107: -1,63 (p = 0,191) sowie miR-181a-3p: 1,08 (p = 0,572) und miR-181a-5p: -1,46 (p = 0,25). Kreise markieren Probandinnen, die im ersten Trainingsblock das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). Diese Unterscheidung wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3). IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; hsa-: *Homo sapiens*; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten. b) Übersicht zu den *Fold changes* von miR-128-3p, miR-21-3p/-5p, miR-107 und miR-181a-3p/-5p. Ausreißer und Extremwerte sind nicht dargestellt.

#### 3.1.1.4 Vergleich der Literaturdaten für miR-9 und miR-31

Des Weiteren postulierten Russel et al. (2013) eine Abnahme von miR-9(-5p) sowie miR-31(-5p) in der Skelettmuskulatur nach einem akuten Ausdauertraining. Dies konnte in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray-Analyse nicht verifiziert werden: Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von miR-9-3p und miR-9-5p (*Fold change*: -1,06 ( $p = 0,573$ ) bzw. 1,14 ( $p = 0,091$ )) sowie miR-31-3p und miR-31-5p (*Fold change*: -1,1 ( $p = 0,384$ ) bzw. 1,09 ( $p = 0,422$ )) (s. Abbildung 16a, b). Die *Fold changes* sind für eine bessere Vergleichbarkeit der miRNAs untereinander in Abbildung 16b in Box-Plots dargestellt. Ausreißer und Extremwerte sind wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, nicht abgebildet.





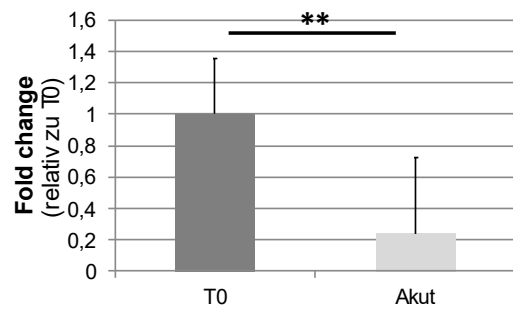
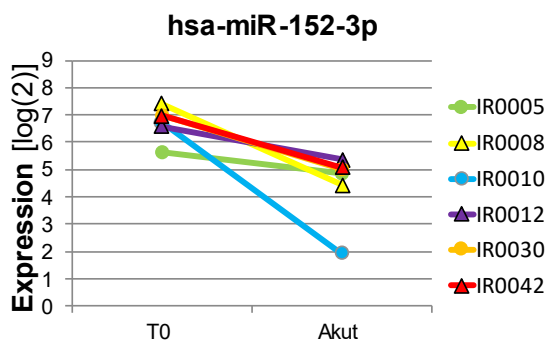
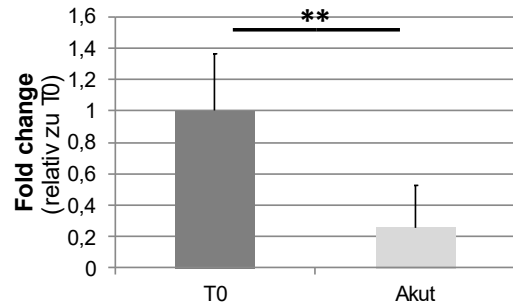
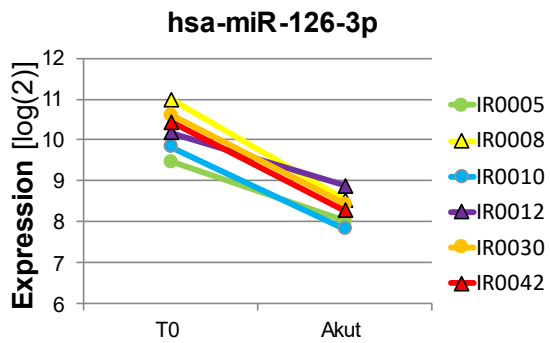
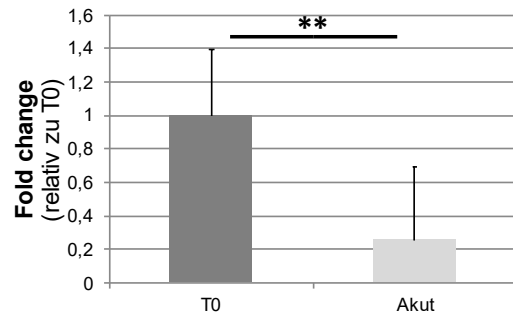
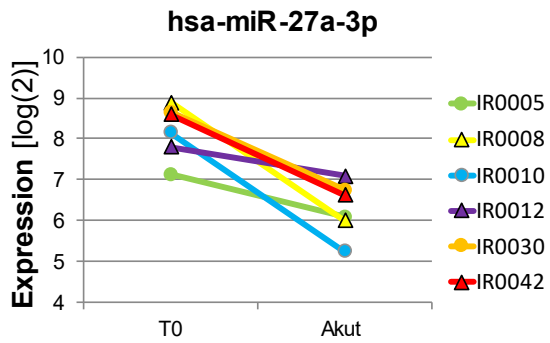
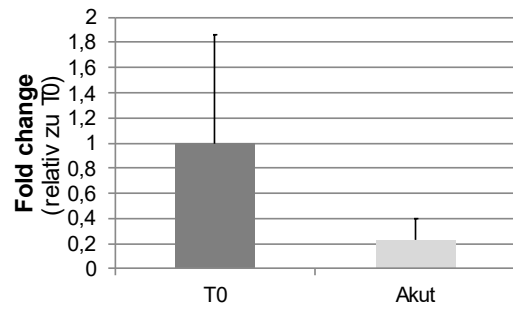
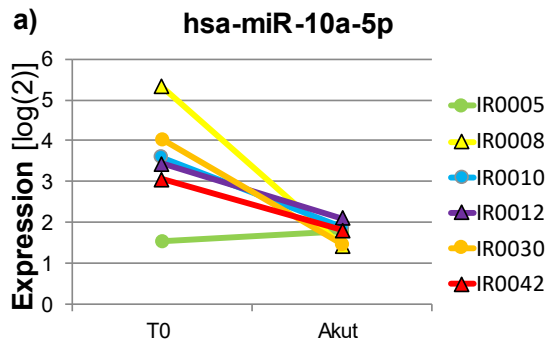
**Abbildung 16: Mikroarray-Daten für miR-9 und miR-31.** a) Linke Spalte: Veränderung der miRNA-Expression zwischen den Zeitpunkten T<sub>0</sub> und T<sub>Akut</sub> in den einzelnen Probandinnen der Mikroarray-Analyse (n = 6). Die Werte sind im *Logarithmus dualis* aufgetragen. Rechte Spalte: Expression der miRNAs zum Zeitpunkt T<sub>Akut</sub> relativ zum Zeitpunkt T<sub>0</sub>. a) Es errechneten sich folgende *Fold changes*: miR-9-3p: -1,06 (p = 0,573), miR-9-5p: 1,14 (p = 0,091), miR-31-3p: -1,1 (p = 0,384), miR-31-5p: 1,09 (p = 0,422). Kreise markieren Probandinnen, die im ersten Trainingsblock das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). Diese Unterscheidung wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3). IR: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; hsa-: *Homo sapiens*; T<sub>0</sub>: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3). b) Übersicht zu den *Fold changes* von miR-9-3p/-5p und miR-31-3p/-5p. Ausreißer und Extremwerte sind nicht dargestellt.

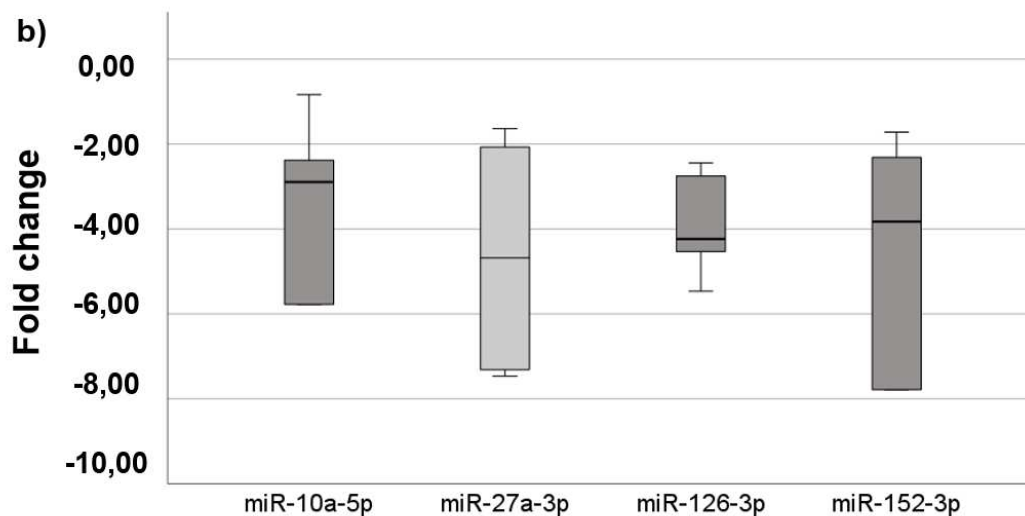
### 3.1.1.5 Vergleich der Literaturdaten für miR-10a-5p, miR-27a-3p, miR-126-3p und miR-152-3p

Die physiologische Adaptation in Reaktion auf Ausdauertraining wird hauptsächlich durch eine Steigerung der oxidativen Kapazität bestimmt, welche durch die Erhöhung der mitochondrialen Biogenese, der muskulären Kapillardichte und der Fettsäureoxidation sowie der Dominanz von Typ I-Muskelfasern erzielt wird (s. Kapitel 1.1.1). In diese Prozesse scheinen miR-10a-5p (Wang et al., 2016), miR-27a-3p (Chemello et al., 2019; Chen et al., 2013; Huang et al., 2012; McLean et al., 2015; Safdar et al., 2011), miR-126-3p (Fish et al., 2008; Suárez & Sessa, 2009) sowie miR-152-3p (Zhang et al., 2019) regulatorisch einzugreifen. Aus diesem Grund wurden die Mikroarray-Daten dieser miRNAs ebenfalls ausgewertet. Hierbei zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme von miR-27a-3p (*Fold change*: -4,64;  $p = 0,007^{**}$ ), miR-126-3p (*Fold change*: -3,94;  $p = 0,003^{**}$ ) sowie miR-152-3p (*Fold change*: -7,82;  $p = 0,005^{**}$ ). Für miR-10a-5p errechnete sich eine *Fold change* von -4,93 ( $p = 0,086$ ) (s. Abbildung 17a, b). Die *Fold changes* sind für eine bessere Vergleichbarkeit der miRNAs untereinander in Abbildung 17b in Box-Plots dargestellt. Ausreißer sind wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, nicht abgebildet.

Da die Kapazität der qPCR-Experimente auf Grund der Probenmaterialmenge begrenzt war, wurde lediglich miR-27a-3p für die detaillierte Analyse ausgewählt, da diese miRNA-Spezies eine Vielzahl der adaptiven Prozesse zu beeinflussen scheint: Studien legen eine regulatorische Funktion von miR-27a-3p bei der mitochondrialen Biogenese (McLean et al., 2015; Safdar et al., 2011), der Fettsäureoxidation (Chemello et al., 2019), der Fasertyp-Konversion (Chemello et al., 2019) und auch der Muskelregeneration nahe (Chen et al., 2013; Huang et al., 2012).







**Abbildung 17: Mikroarray-Daten für miR-10a-5p, miR-27a-3p, miR-126-3p und miR-152-3p.** a) Linke Spalte: Veränderung der miRNA-Expression zwischen den Zeitpunkten T<sub>0</sub> und T<sub>Akut</sub> in den einzelnen Probandinnen der Mikroarray-Analyse (n = 6). Die Werte sind im *Logarithmus dualis* aufgetragen. Rechte Spalte: Expression der miRNAs zum Zeitpunkt T<sub>Akut</sub> relativ zum Zeitpunkt T<sub>0</sub>. Es errechneten sich folgende *Fold changes*: miR-10a-5p: -4,93 (p = 0,086), miR-27a-3p: -4,64 (p = 0,007\*\*), miR-126-3p: -3,94 (p = 0,003\*\*) und miR-152-3p: -7,82 (p = 0,005\*\*). Kreise markieren Probandinnen, die im ersten Trainingsblock das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). Diese Unterscheidung wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3). Das Zeichen (\*\*) markiert eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten. IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; hsa-: *Homo sapiens*; T<sub>0</sub>: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3). b) Übersicht zu den *Fold changes* von miR-10a-5p, miR-27a-3p, miR-126-3p und miR-152-3p. Hellgraue Box-Plots markieren miRNA-Spezies, die in folgenden qPCR-Experimenten weiter getestet wurden (s. Kapitel 3.2). Ausreißer und Extremwerte sind nicht dargestellt.

### 3.1.2 Identifikation stark regulierter miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur

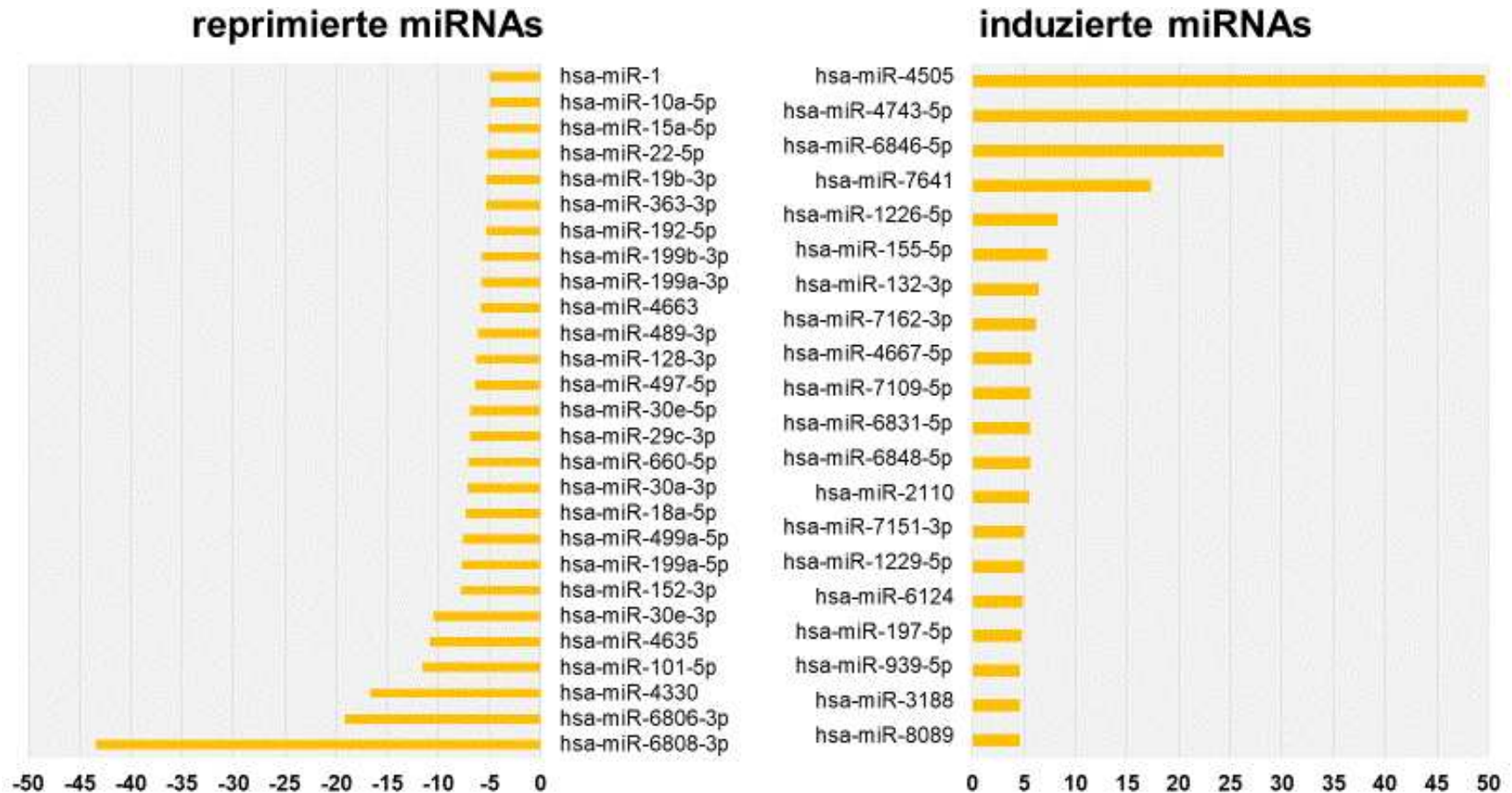
In der Mikroarray-Untersuchung wurden insgesamt 2010 Vorläufer- sowie 2592 reife miRNAs in den Skelettmuskelbiopsien detektiert. Die Vorläufer-miRNAs wurden dabei in dieser Arbeit nicht in die weitere Analyse inkludiert. In Mikroarray-Analysen wird häufig eine *Fold change* mit dem Faktor  $\geq 2$  für die Definition unterschiedlicher Expression gewählt (Zhao et al., 2018). Dieses Kriterium erfüllten in der vorliegenden Studie 326 miRNAs, weshalb ein Grenzwert von  $\geq 4,5$  bzw.  $\leq -4,5$  als Einschlusskriterium festgelegt wurde. Diese Definition orientierte sich auf der einen Seite daran, eine handhabbare Anzahl an miRNAs für die weitere Analytik zu generieren, auf der anderen Seite birgt ein zu hoher Schwellenwert die Gefahr, miRNAs, die tatsächlich an der Trainingsadaptation beteiligt sind, frühzeitig aus der weiteren Analyse auszuschließen und somit signifikante Beziehungen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den physiologischen Trainingseffekten zu übersehen. Durch das gewählte Einschlusskriterium reduzierte sich die Anzahl der miRNAs für die weiterführenden Analysen auf 55, von denen 20 induziert und 35 reprimiert waren (s. Tabelle 8, Abbildung 18). Die entsprechenden Veränderungen waren für alle dieser miRNAs signifikant.

miRNA	T <sub>0</sub> (log(2))	T <sub>Akut</sub> (log(2))	Fold change
hsa-miR-5189-3p	9,16	0,8	-356,42
hsa-miR-2115-5p	7,54	0,65	-134,84
hsa-miR-6808-3p	6,13	0,73	-43,36
hsa-miR-6806-3p	4,77	0,63	-19,12
<b>hsa-miR-4330</b>	<b>4,24</b>	<b>0,56</b>	<b>-16,64</b>
hsa-miR-101-5p	4,1	0,65	-11,54
hsa-miR-4635	3,72	0,7	-10,8
hsa-miR-30e-3p	4,97	2,11	-10,49
hsa-miR-152-3p	6,71	4,44	-7,82
<b>hsa-miR-199a-5p</b>	<b>4,66</b>	<b>2,12</b>	<b>-7,69</b>
<b>hsa-miR-499a-5p</b>	<b>3,63</b>	<b>1,64</b>	<b>-7,61</b>

<b>miRNA</b>	<b>T<sub>0</sub> (log(2))</b>	<b>T<sub>Akut</sub> (log(2))</b>	<b>Fold change</b>
hsa-miR-18a-5p	5,67	3,74	-7,39
hsa-miR-30a-3p	7,29	4,83	-7,15
hsa-miR-660-5p	3,6	1,23	-7,06
hsa-miR-29c-3p	3,14	1,29	-6,91
hsa-miR-30e-5p	4,86	2,35	-6,87
hsa-miR-497-5p	3,12	1,12	-6,46
hsa-miR-128-3p	6,07	3,92	-6,36
hsa-miR-489-3p	4,5	2,73	-6,19
hsa-miR-4663	2,83	0,79	-5,85
hsa-miR-199a-3p	7,62	5,42	-5,80
hsa-miR-199b-3p	7,62	5,42	-5,80
hsa-miR-192-5p	3,40	1,97	-5,36
hsa-miR-363-3p	4,15	2,115	-5,36
hsa-miR-19b-3p	7,93	5,71	-5,33
hsa-miR-22-5p	3,53	1,90	-5,26
hsa-miR-15a-5p	5,86	3,73	-5,12
hsa-miR-10a-5p	3,5	1,75	-4,93
hsa-miR-1	10,22	8,12	-4,91
hsa-miR-106b-5p	7,91	6,45	-4,77
hsa-miR-3175	2,16	2,04	-4,74
hsa-miR-362-5p	3,75	2,68	-4,69
hsa-miR-27a-3p	8,21	6,22	-4,64
hsa-miR-4306	3,06	2,04	-4,57
hsa-miR-133a-5p	6,97	4,98	-4,54
hsa-miR-8089	3,13	4,99	4,60
hsa-miR-3188	2,75	4,48	4,62
hsa-miR-939-5p	1,76	3,67	4,65
hsa-miR-197-5p	3,75	5,725	4,85
hsa-miR-6124	3,57	5,475	4,92
hsa-miR-1229-5p	2,66	4,60	4,97

miRNA	T0 (log(2))	T <sub>Akut</sub> (log(2))	Fold change
hsa-miR-7151-3p	1,05	3,3	5,08
hsa-miR-2110	2,77	4,72	5,57
hsa-miR-6848-5p	2,48	4,69	5,60
hsa-miR-6831-5p	4,78	6,53	5,64
hsa-miR-7109-5p	3,60	5,70	5,66
hsa-miR-4667-5p	2,69	4,68	5,74
hsa-miR-7162-3p	1,53	3,93	6,15
hsa-miR-132-3p	1,86	4,25	6,46
hsa-miR-155-5p	0,97	3,605	7,32
hsa-miR-1226-5p	1,26	4,25	8,32
hsa-miR-7641	4,055	5,46	17,34
hsa-miR-6846-5p	1,53	6,12	24,37
hsa-miR-4743-5p	2,42	7,98	47,98
hsa-miR-4505	6,08	11,44	49,64

**Tabelle 8: Übersicht über stark regulierte miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur in der Mikroarray-Analyse.** Aufgelistet sind alle miRNAs, die bei der Mikroarray-Analyse (n = 6) eine Veränderung der Expression um den Faktor  $\geq 4,5$  bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur aufwiesen. Angegeben sind die Werte zum Zeitpunkt T0 und T<sub>Akut</sub> im *Logarithmus dualis* (berechnet durch die Transcriptome Analysis Console (TAC), Version 4.0.2.15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Rot markierte miRNAs wurden in den anschließenden qPCR-Experimenten weiter untersucht. T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; T<sub>Akut</sub>: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); hsa-: *Homo sapiens*.



**Abbildung 18 : Übersicht der induzierten und reprimierten miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur in der Mikroarray-Analyse.** Aufgelistet sind alle miRNAs, die bei der Mikroarray-Analyse (n = 6) eine Veränderung der Expression um den Faktor  $\geq 4,5$  bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur aufwiesen. Links sind die bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur reprimierten miRNAs dargestellt. Die miRNA-Spezies miR-5189-3p und miR-2115-5p wurden zur besseren Darstellung in der Abbildung nicht abgebildet. Rechts sind die bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur induzierten miRNAs dargestellt. Hsa-: *Homo sapiens*.

### 3.1.3 Korrelation zwischen der trainingsinduzierten $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der Mikroarray-Analyse

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderung des miRNA-Profiles in Zusammenhang mit physiologischen Trainingseffekten zu setzen. Daher wurde die durch eine akute Ausdauerbelastung induzierte Expressionsänderung derjenigen miRNAs, die Tabelle 8 entnommen werden können, mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ , die durch ein sechswöchiges Ausdauertraining erzielt wurde ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$ ), korreliert. Die  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Daten der sechs Probandinnen der Mikroarray-Analyse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Probandinnen-ID	$\dot{V}O_2\text{max. T0}$ [ml/kg×min]	$\dot{V}O_2\text{max. T1}$ [ml/kg×min]	$\Delta\dot{V}O_2\text{max. T0/T1}$ [ml/kg×min]	1. Trainingsblock
IR0005	33,2	38,9	5,7	MICT
IR0008	32,8	37,6	4,8	HIIT
IR0010	30,7	34,0	3,3	MICT
IR0012	29,2	33,2	4,0	HIIT
IR0030	33,5	36,2	2,7	MICT
IR0042	30,8	35,0	4,2	HIIT
<b>MW</b>	31,7	35,9	4,1	
<b>SD ±</b>	1,6	2,0	1,0	

**Tabelle 9:  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Daten der Probandinnen der Mikroarray-Analyse.** Aufgelistet sind die  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Werte [ml/kg×min] vor Beginn der Studie ( $\dot{V}O_2\text{max T0}$ ), nach Beendigung des ersten Trainingsblocks ( $\dot{V}O_2\text{max T1}$ ) sowie die Veränderung der  $\dot{V}O_2\text{max}$  zwischen den Zeitpunkten T0 und T1 ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$ ) der sechs Probandinnen, deren Skelettmuskelbiopsien mittels Mikroarray analysiert wurden.  $\dot{V}O_2\text{max}$ : maximale Sauerstoffaufnahme; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; MICT: moderat-intensives kontinuierliches Training; HIIT: hochintensives Intervalltraining. Die Unterscheidung der beiden Trainingsmodalitäten wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3).

Gemäß den Berechnungen der freiverfügbaren *Software* G\*Power v. 3.1.9.7 (Faul et al., 2007) wurde eine starke Korrelation ab einem Korrelationskoeffizienten von  $r = \geq 0,7$  bzw.  $r = \leq -0,7$  angenommen (s. Tabelle 10).

n	lrl		n	lrl
5	0,8		12	0,5
6	0,7		13	0,5
7	0,7		14	0,5
8	0,6		15	0,4
9	0,6		16	0,4
10	0,6			
11	0,5		29	0,3

**Tabelle 10 Berechnung des Grenzwertes für den Korrelationskoeffizienten r.** Für die Korrelationsanalysen wurde der Schwellenwert des Korrelationskoeffizienten r nach Spearman mit Hilfe der *Software* G\*Power v. 3.1.9.7 berechnet (Faul et al., 2007). Diese berechnet den Schwellenwert für r, ab welchem eine starke Korrelation angenommen werden kann, in Abhängigkeit der Anzahl der Testpersonen n.

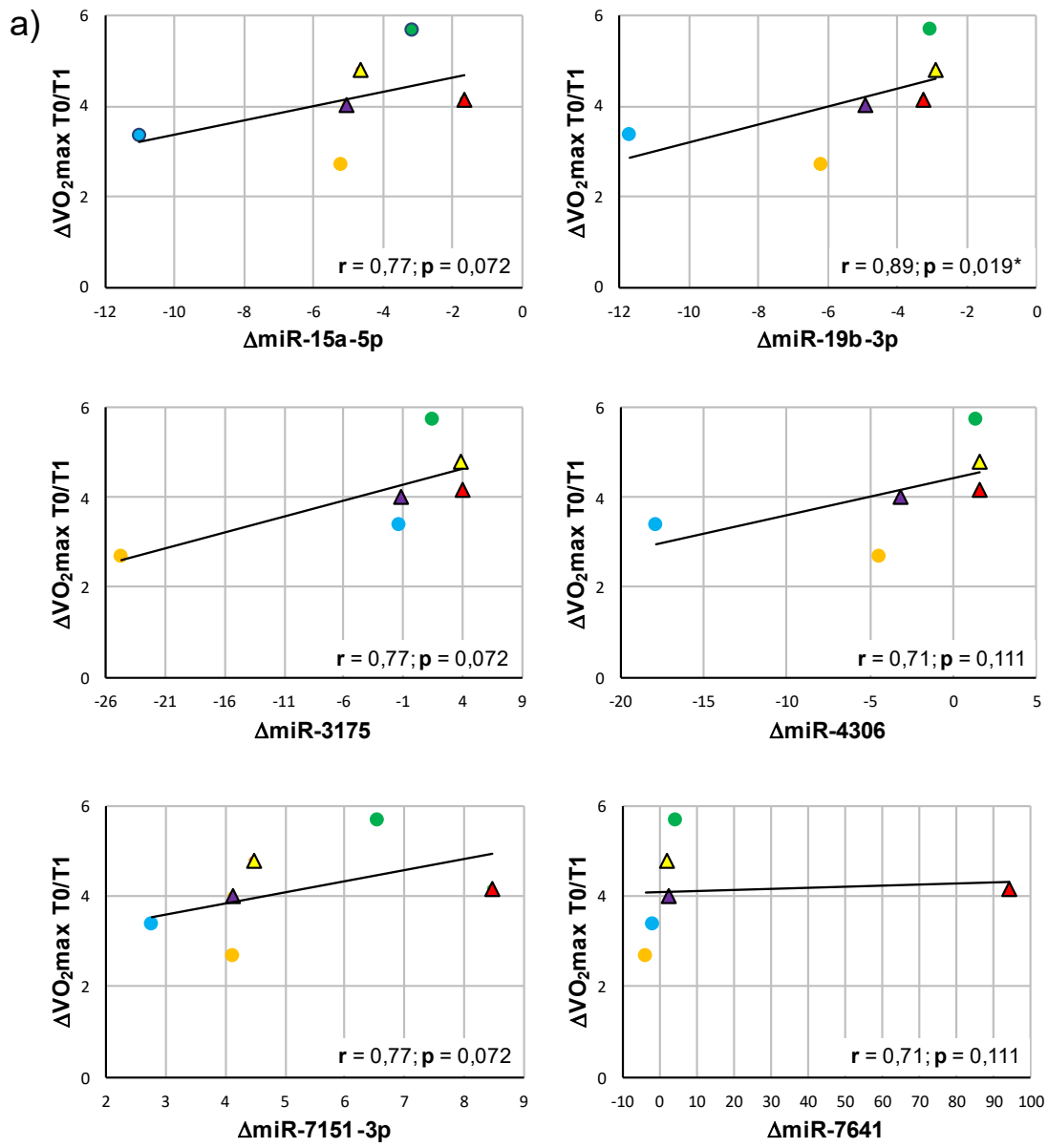
Hierdurch wurden zehn miRNAs detektiert, die eine starke Korrelation mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$  aufwiesen. Die Veränderung von sechs miRNAs (miR-15a-5p, miR-19b-3p, miR-3175, miR-4306, miR-7151-3p, miR-7641) korrelierte dabei positiv mit dem Trainingseffekt, vier miRNAs (miR-4667-5p, miR-4743-5p, miR-6831-5p, miR-7109-5p) zeigten eine negative Korrelation. Signifikant waren diese Korrelationen hierbei für miR-19b-3p, miR-4667-5p, miR-6831-5p sowie miR-7109-3p (s. Tabelle 11, Abbildung 19a).

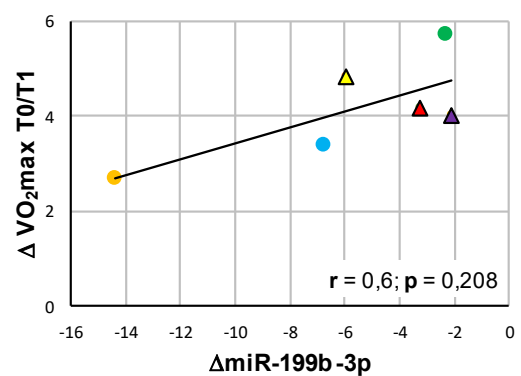
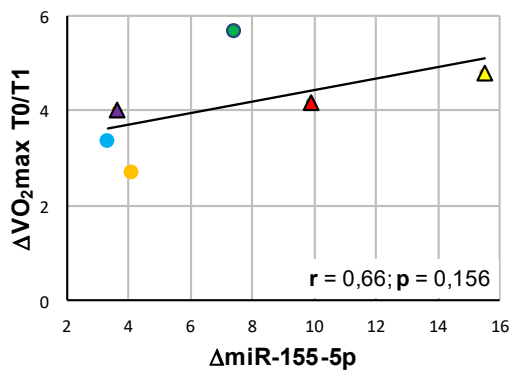
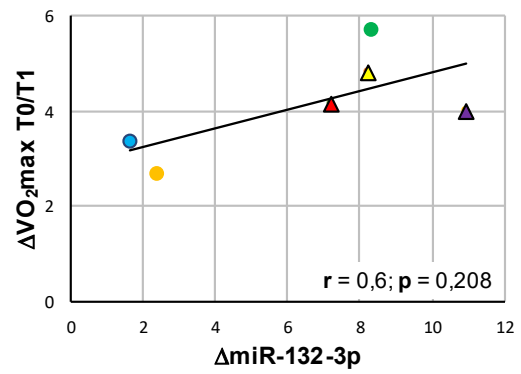
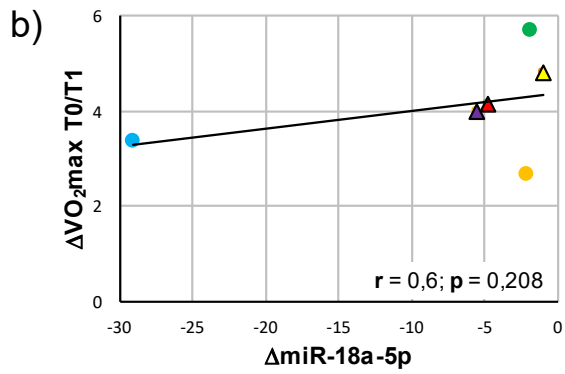
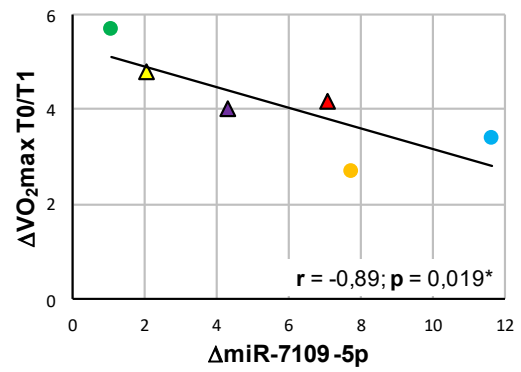
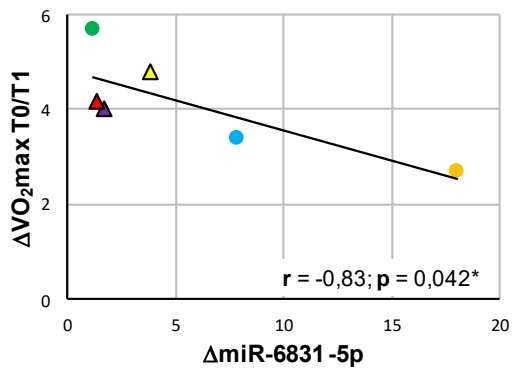
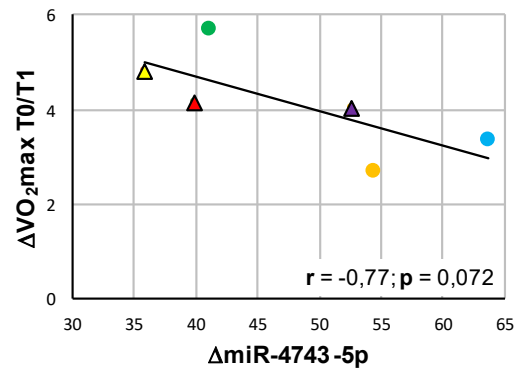
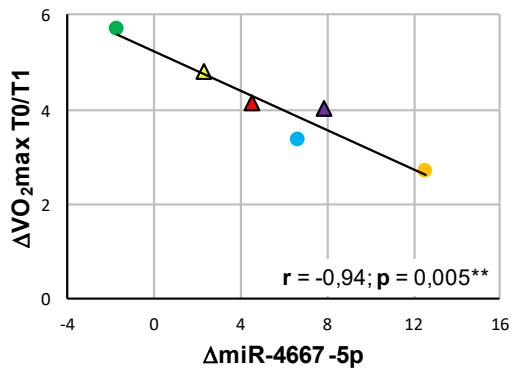
Neun miRNAs (miR-18a-5p, miR-132-3p, miR-155-5p, miR-197-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b-3p, miR-497-5p, miR-4330) unterschritten den festgelegten Schwellenwert geringfügig ( $r = [0,6; 0,7]$  bzw.  $r = (-0,7; -0,6]$ ) und könnten daher ebenfalls interessante Kandidaten als molekulare Marker für die Vorhersage der individuellen Trainingsreaktion darstellen (s. Tabelle 11, Abbildung 19b).

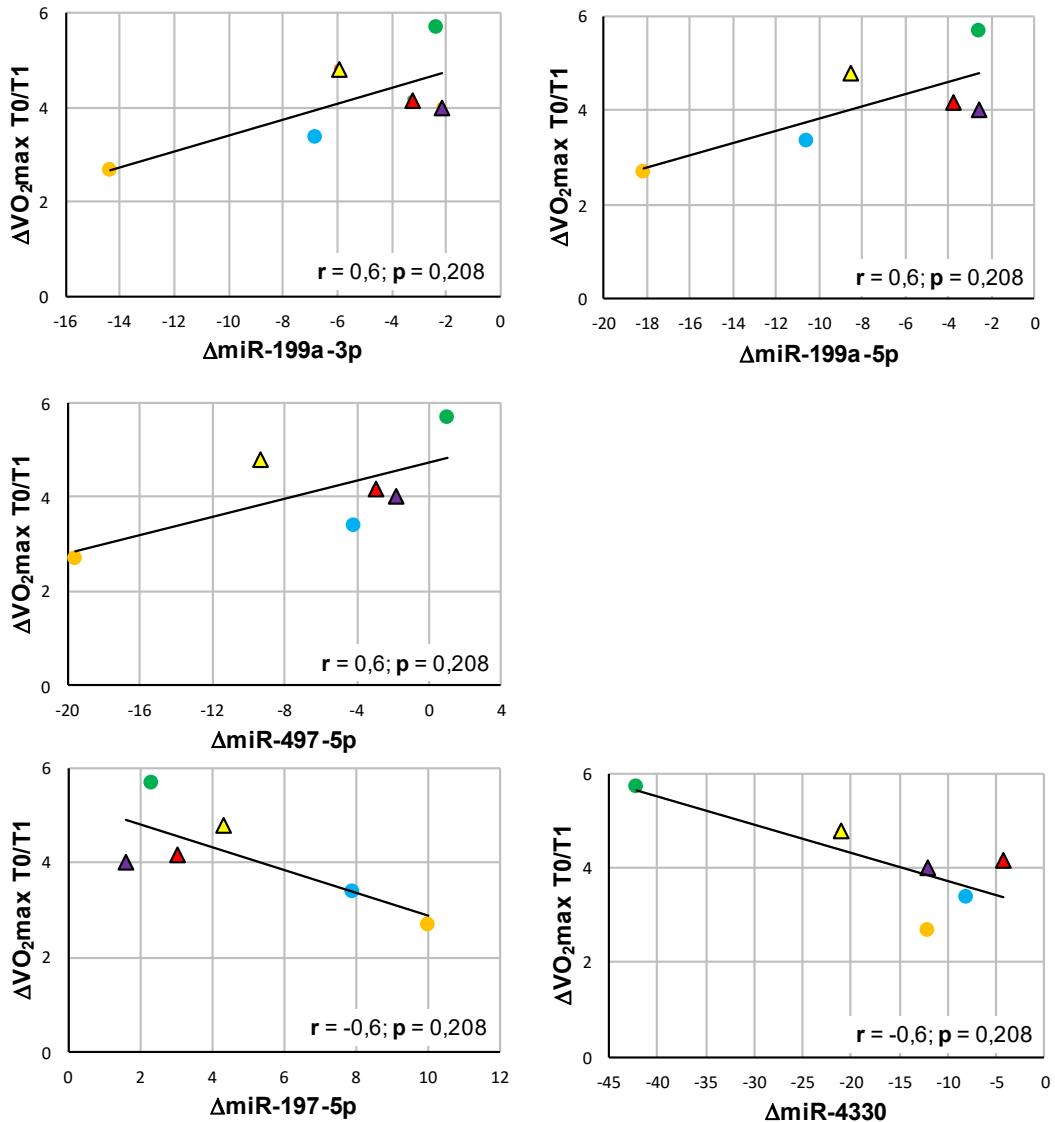


miRNA	Korrelationskoeffizient r nach Spearman	p-Wert
hsa-miR-15a-5p	0,77	0,072
hsa-miR-18a-5p	0,6	0,208
hsa-miR-19b-3p	0,89	0,019*
hsa-miR-132-3p	0,6	0,208
hsa-miR-155-5p	0,66	0,156
hsa-miR-199a-3p	0,6	0,208
hsa-miR-199a-5p	0,6	0,208
hsa-miR-199b-3p	0,6	0,208
hsa-miR-497-5p	0,6	0,208
hsa-miR-3175	0,77	0,072
hsa-miR-4306	0,71	0,111
hsa-miR-7151-3p	0,77	0,072
hsa-miR-7641	0,71	0,111
hsa-miR-197-5p	-0,6	0,208
hsa-miR-4330	-0,6	0,208
hsa-miR-4667-5p	-0,94	0,005**
hsa-miR-4743-5p	-0,77	0,072
hsa-miR-6831-5p	-0,83	0,042*
hsa-miR-7109-5p	-0,89	0,019*

**Tabelle 11: Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$  und den belastungsinduzierten miRNA-Aktmustern der Mikroarray-Analyse.** Ein Korrelationskoeffizient nach Spearman von  $r = \geq 0,7$  bzw.  $\leq -0,7$  zeigt eine starke Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$  und der Veränderung der miRNA-Expression an. Eine mäßig starke Korrelation entspricht einem Korrelationskoeffizienten von  $r = [0,6; 0,7]$  bzw.  $r = (-0,7; -0,6]$ . Ein (\*) markiert eine signifikante, ein (\*\*) markiert eine hochsignifikante Korrelation. Rot markierte miRNAs wurden in den anschließenden qPCR-Experimenten weiterführend analysiert.  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$ : Veränderung der maximalen Sauerstoffaufnahme [ml/kg×min] zwischen Trainingsbeginn (T0) und Beendigung des ersten Trainingsblocks (T1); hsa-: *Homo sapiens*.







**Abbildung 19: Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_2\max T0/T1$  und den belastungsinduzierten miRNA-Aktmustern der Mikroarray-Analyse.** a) Dargestellt sind die Regressionsgeraden der miRNAs, die eine starke Korrelation ( $r = \geq 0,7$  bzw.  $\leq -0,7$ ) mit der  $\Delta\dot{V}O_2\max T0/T1$  [ml/kg×min] aufwiesen. b) Dargestellt sind die Regressionsgeraden der miRNAs, die eine mäßig starken Korrelation ( $r = [0,6; 0,7]$  bzw.  $r = [-0,7; -0,6]$ ) mit der  $\Delta\dot{V}O_2\max T0/T1$  [ml/kg×min] zeigten. Die r- sowie p-Werte jeder miRNA können den Graphen entnommen werden. Kreise markieren Probandinnen, die im ersten Trainingsblock das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). Diese Unterscheidung wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Aktmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3).  $\Delta miR$ :- Veränderung der miRNA-Expression in der Skelettmuskulatur in Antwort auf eine einzelne aeroben Belastung;  $\Delta\dot{V}O_2\max T0/T1$ : Veränderung der maximalen Sauerstoffaufnahme zwischen den Zeitpunkten vor Trainingsbeginn (T0) und nach Beendigung des ersten Trainingsblocks (T1); r: Spearmansche Korrelationskoeffizient; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer: ● IR0005, ● IR0010, ● IR0030, ▲ IR0008, ▲ IR0012, ▲ IR00042.

### **3.1.4 KEGG-Signalweganalyse der stark regulierten miRNAs bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur**

In der Mikroarray-Analyse wurden 55 miRNAs detektiert, die eine starke Regulation bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur aufwiesen. Mit Hilfe der Datenbank TarBase v7.0 der *Online*-Plattform DIANA-miRPath v3.0 (Vlachos et al., 2015) sollte die Funktion dieser miRNAs näher charakterisiert werden. DIANA-TarBase v7.0 ist die größte katalogisierte Datenbank von experimentell validierten miRNA-mRNA-Interaktionen ergänzt mit detaillierten Metadaten. DIANA-TarBase v7.0 umfasst dabei mehr als 600.000 experimentell verifizierte miRNA-Gen-Interaktionen, die 24 Spezies und 356 verschiedene Zelltypen umfassen (Vlachos et al., 2015). Zudem ermöglicht es DIANA-TarBase v7.0 den Nutzern, positive oder negative experimentelle Ergebnisse, die verwendete experimentelle Methodik sowie die experimentellen Versuchsbedingungen einschließlich der analysierten Zelltypen/Gewebe leicht zu identifizieren (Vlachos & Hatzigeorgiou, 2017). Daher wurde dieser Algorithmus in dieser Arbeit angewandt. Eine Korrektur der Falscherkennungsrate wurde in jeder Analyse auf Grund der tausenden analysierten miRNA-Gen-Interaktionen mitdurchgeführt.

In Reaktion auf einen akuten Belastungsreiz wurden 20 miRNAs in der Skelettmuskulatur induziert. Die DIANA-TarBase-Analyse identifizierte hiervon drei miRNAs, die regulatorisch in die Fettsäurebiosynthese (miR-1226-5p, miR-2110) und den Fettsäuremetabolismus (miR-155-5p, miR-1226-5p, miR-2110) einzugreifen scheinen sowie zwei miRNAs (miR-197-5p und miR-132-3p), die an der O-Glykanbiosynthese regulatorisch mitwirken könnten (s. Tabelle 12) (Vlachos et al., 2015).

	Signalweg	p-Wert	Gene	miRNA
1.	Fettsäurebiosynthese (hsa00061)	$<1e^{-325}$	2	-2110 -1226-5p
2.	Fettsäuremetabolismus (hsa01212)	$4,10e^{-11}$	9	-155-5p -1226-5p -2110
3	O-Glykanbiosynthese - andere Typen (hsa00514)	0,0018	5	-132-3p -197-5p

**Tabelle 12: KEGG-Signalweganalyse der in der Mikroarray-Analyse induzierten miRNAs.** Die Signalweganalyse wurde mit Hilfe der Datenbank TarBase v7.0 der *Online*-Plattform DIANA-miRPath v3.0 durchgeführt (Vlachos et al., 2015). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; (hsa-): KEGG-Signalweg-Identifikationsnummer.

In der Akutantwort der Skelettmuskulatur wurden zudem 35 miRNAs reprimiert, welche Zielgene in insgesamt 23 Signalwegen aufwiesen (s. Tabelle 13) (Vlachos et al., 2015). Von diesen miRNAs wurden mittels DIANA-TarBase-Analyse 21 miRNAs identifiziert (Vlachos et al., 2015), die regulatorisch in Signalwege einzugreifen scheinen, die in vorherigen Studien mit der Trainingsanpassung in Verbindung gebracht wurden. Spezifisch sind diese miRNAs wiederum an der Regulation von Fettsäurebiosynthese und Fettsäuremetabolismus beteiligt. Darüber hinaus ist die Beteiligung dieser miRNAs an Signalwegen, die die Proteinsynthese und -degradation regulieren (TGF $\beta$ -, FOXO-, sowie Hippo-Signalweg) in Zusammenhang mit Prozessen der Trainingsanpassung interessant (De Angelis et al., 1998; Goodman et al., 2015; Judson et al., 2012; Liu et al., 2001; Liu et al., 2004; Sandri et al., 2004; Sartori et al., 2009; Stitt et al., 2004). Zudem zeigten zwölf miRNAs eine Beteiligung am p53-Signalweg, welcher über die Stimulation der mitochondrialen Biogenese zu einer gesteigerten oxidativen Kapazität führt (Hu et al., 2010; Park et al., 2009; Saleem et al., 2014; Saleem & Hood, 2013; Wang et al., 2012) (s. Kapitel 1.1.2.2)

	<b>Signalweg</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Anzahl Gene</b>	<b>miRNA</b>	
<b>1</b>	Prionen-Erkrankungen (hsa05020)	$<1^{e-325}$	18	-22-5p -30a-3p -106b-5p	-27a-3p -30e-3p -192-5p
<b>2</b>	Fettsäurebiosynthese (hsa00061)	$<1^{e-325}$	5	-10a-5p -27a-3p -30e-5p -199a-3p	-15a-5p -29c-3p -199b-5p
<b>3</b>	Fettsäuremetabolismus (hsa01212)	$<1^{e-325}$	22	-10a-5p -27a-3p -30e-5p -199b-3p -660-5p	-15a-5p -29c-3p -199a-3p -363-3p
<b>4</b>	ECM-Rezeptor-Interaktion (hsa04512)	$<1^{e-325}$	43	-22-5p -27a-3p -30a-3p -101-5p -497-5p	-19b-3p -29c-3p -30e-3p -199a-5p
<b>5</b>	Virale Karzinogenese (hsa05203)	$<1^{e-325}$	121	-15a-5p -19b-3p -27a-3p -30a-3p -30e-5p -2115-5p	-18a-5p -22-5p -29c-3p -30e-3p -362-5p
<b>6</b>	Hippo-Signalweg (hsa04390)	$<1^{e-325}$	100	-10a-5p -18a-5p -29c-3p -30e3p -199a-5p	-15a-5p -22-5p -30a-3p -192-5p -497-5p
<b>7</b>	Proteoglykane in Krebs (hsa05205)	$<1^{e-325}$	140	-15a-5p -22-5p -29c-3p -30e-3p -106b-5p -199a-5p	-19b-3p -30a-3p -30e-5p -27a-3p -199a-3p -497-5p
<b>8</b>	Lysin-Degradation (hsa00310)	$9,24^{e-07}$		-15a-5p -22-5p -30a-3p -30e-5p -192-5p -660-5p	-18a-5p -29c-3p -30e-3p -106b-5p -497-5p -2115-5p
<b>9</b>	Zellzyklus (hsa04110)	$1,19^{e-03}$	82	-15a-5p -27a-3p -30e-3p -101-5p -192-5p	-18a-5p -30a-3p -30e-5p -106b-5p -499a-5p

	Signalweg	p-Wert	Anzahl Gene	miRNA	
10	p53-Signalweg (hsa04115)	6,19 <sup>e-03</sup>	46	-15a-5p -19b-3p -29c-3p -30e-3p -106b-5p -499a-5p	-18a-5p -27a-3p -30a-3p -30e-5p -497-5p -660-5p
11	Adhäsionsverbindungen (hsa04520)	9,10 <sup>e-03</sup>	52	-15a-5p -27a-3p -106b-5p -362-5p	-22-5p -30e-5p -199a-5p -497-5p
12	TGFβ-Signalweg (hsa04350)	1,36 <sup>e-02</sup>	50	-15a-5p -19b-3p -30a-3p -106b-5p -497-5p	-18a-5p -27a-3p -30e-3p -199a-5p
13	Steroidbiosynthese (hsa00100)	1,87 <sup>e-01</sup>	10	-18a-5p -30a-3p -199a-3p -362-5p	-29c-3p -30e-3p -192-5p -199b-3p
14	Hepatitis B (hsa05161)	2,86 <sup>e-05</sup>	84	-15a-5p -27a-3p -30a-3p -106b-5p	-19b-3p -29c-3p -30e-3p -497-5p
14	chronisch-myeloische Leukämie (hsa05220)	3,03 <sup>e-03</sup>	51	-19b-3p -29c-3p -30e-3p -106b-5p	-27a-3p -30a-3p -101-5p -497-5p
15	Signalwege in Krebs (hsa05200)	5,54 <sup>e-05</sup>	185	-18a-5p -30a-3p -30e-5p -106b-5p	-27a-3p -30e-3p -101-5p -497-5p
16	Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum (hsa04141)	0,0004	109	-15a-5p -27a-3p -106b-5p	-22-5p -30e-5p -497-5p
17	Gliom (hsa05214)	0,0012	39	-19b-3p -106b-5p	-27a-3p -497-5p
18	kolorektales Karzinom (hsa05210)	0,0053	45	-19b-3p -29c-3p -101-5p -192-5p -497-5p	-27a-3p -30e-5p -106b-5p -199a-5p
19	FOXO-Signalweg (hsa04068)	0,0057	79	-19b-3p -29c-3p -30e-3p -497-5p	-27a-3p -30a-3p -106b-5p



	Signalweg	p-Wert	Anzahl Gene	miRNA	
20	Muzin-Typ O-Glykanbiosynthese (hsa00512)	0,0086	12	-27a-3p -30e-3p	-30a-3p -30e-5p
21	Oozyten Meiose (hsa04114)	0,0101	59	-15a-5p -30e-5p	-27a-3p -101-5p
22	Prostatakarzinom (hsa05215)	0,017	60	-15a-5p -27a-3p -101-5p -497-5p	-19b-3p -30e-3p -106b-5p

**Tabelle 13: KEGG-Signalweganalyse der in der Mikroarray-Analyse reprimierten miRNAs.** Die Signalweganalyse wurde mit Hilfe der Datenbank TarBase v7.0 der *Online*-Plattform DIANA-miRPath v3.0 durchgeführt (Vlachos et al., 2015). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; TGF $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; FOXO: Forkhead-Box-Protein O; ECM: Extrazellulärmatrix; (hsa-): KEGG-Signalweg-Identifikationsnummer.

## 3.2 qPCR-Analyse

### 3.2.1 Auswahl der zu analysierenden miRNAs

Die Mikroarray-Analyse bildete die Grundlage für die Planung der weiteren qPCR-Experimente. In einem nächsten Schritt wurden daher 19 miRNAs, welche alle im Mikroarray in signifikantem Maße reguliert waren, in einer größeren Kohorte (n = 29) untersucht. Die Auswahl wurde basierend auf den folgenden Kriterien getroffen: Die myomiRs miR-1, miR-133a-3p, miR-133a-5p, miR-133b sowie miR-499a-5p wiesen alle eine (hoch)signifikante Reduktion mit einer *Fold change* zwischen -2,34 und -7,61 auf (s. Kapitel 3.1.1.1). Darüber hinaus sind sie maßgeblich an der Regulation des muskulären Phänotyps beteiligt (s. Kapitel 1.2.2). Da in der Auswertung der Mikroarray-Daten nicht zwischen miR-1-3p und miR-1-5p unterschieden wird, jedoch miR-1-3p die „dominant“ prozessierte miRNA-Spezies darstellt, wurde diese für die qPCR-Analyse ausgewählt. Die beiden miRNA-Spezies miR-23a-5p und miR-378a-5p wiesen ebenfalls eine signifikante Regulation bei der Akutantwort auf (s. Kapitel 3.1.1.2). Die Abnahme der Expression von miR-378a-5p stand hierbei im Widerspruch zu einschlägigen Literaturdaten (McLean et al., 2015). Darüber hinaus scheint miR-378a-5p an der Regulation der mitochondrialen Biogenese beteiligt zu sein (Carrer et al., 2012; Eichner et al., 2010; Safdar et al., 2009) (s. Kapitel 1.2.3). Des Weiteren wurde miR-23a-5p weiterführend analysiert. In bisherigen Studien wurde bis zu diesem Zeitpunkt insbesondere eine Veränderung der als dominant betrachteten miRNA-Spezies miR-23a-3p in Reaktion auf eine akute Belastung beschrieben (Nielsen et al., 2010; Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009). Jedoch deuten etliche Studien darauf hin, dass bei einer Vielzahl an miRNA-Spezies die Strangauswahl in hohem Maße kontextabhängig (zum Beispiel in Abhängigkeit des Zelltyps oder Entwicklungsstadiums) zu erfolgen scheint (W. Hu et al., 2014; Marco et al., 2010; Zhou et al., 2010). Daher wurde in dieser Arbeit miR-23a-5p weiterführend untersucht, um zu überprüfen, ob der „Passagierstrang“ ebenfalls bei der Akutantwort differenziell exprimiert wird. MiR-27a-3p wurde ebenfalls auf Grund der signifikanten Veränderung bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur (s. Kapitel 3.1.1.5) sowie der vielseitigen regulatorischen Funktionen, die die trainingsinduzierte Adaptation beeinflussen

könnten (Chemello et al., 2019; Chen et al., 2013; Huang et al., 2012; McLean et al., 2015; Safdar et al., 2011), in die folgenden qPCR-Experimenten inkludiert. Elf weitere miRNAs wurden infolge der Korrelation zwischen ihren Akutmustern und der  $\Delta\dot{V}O_{2\max} T0/T1$  ausgewählt (s. Kapitel 3.1.3). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierte bereits eine Reihe von wissenschaftlichen Studien, die die Funktion von miR-15a-5p (Sun et al., 2013; Yin et al., 2012), miR-18a-5p (Chen et al., 2020; Liu et al., 2018; van de Worp et al., 2018), miR-19b-3p (Kong et al., 2019; Margolis et al., 2018; Massart et al., 2021; Rivas et al., 2021), miR-132-3p (Ucar et al., 2012; Zhang et al., 2014), miR-155-5p (Gu et al., 2014; Seok et al., 2011), miR-199a-3p und -5p (Alexander et al., 2013; Chen et al., 2020; Jia et al., 2013; Joris et al., 2018; Zacharewicz et al., 2014) sowie miR-497-5p (Sato et al., 2014; Su et al., 2017; Wei et al., 2016) evaluierten. Die entsprechenden Ergebnisse sprachen dafür, dass diese miRNAs angesichts ihrer funktionellen Eigenschaften vielversprechende Kandidaten als molekulare Marker der Trainingsreaktion darstellen könnten. Darüber hinaus wurden drei weitere miRNAs (miR-4330, miR-4743-5p und miR-7151-3p), deren Akutmuster ebenfalls mit der  $\Delta\dot{V}O_{2\max} T0/T1$  korrelierten (s. Kapitel 3.1.3), ausgewählt. Hierbei stellte miR-4743-5p die am stärksten induzierte, miR-4330 die am stärksten supprimierte miRNA dar, die eine Korrelation mit der  $\Delta\dot{V}O_{2\max} T0/T1$  aufwies (s. Tabelle 8 und 11). Die Akutmuster von vier miRNAs zeigten eine starke positive Korrelation ( $r \geq 0,7$ ) mit der  $\Delta\dot{V}O_{2\max} T0/T1$ , wobei miR-7151-3p die einzige miRNA war, die induziert wurde (s. Tabelle 8 und 11). Daher wurde diese miRNA in die qPCR-Experimente eingeschlossen, um das Spektrum der bei der Akutantwort induzierten miRNAs zu erweitern. Darüber hinaus ermöglichte die Wahl dieser drei miRNAs, das Verständnis über neue, bisher weitgehend unerforschte miRNA-Spezies zu erweitern.

### **3.2.2 Auswahl der Referenz-miRNAs**

Die Berechnung der relativen Expression einer Ziel-miRNA mittels qPCR basiert auf der Verwendung von Referenz-miRNAs als endogene Kontrollen. Diese sollten unter den Versuchsbedingungen konstante Ct-Werte aufweisen, andernfalls würden sie zu einer unzuverlässigen Quantifizierung führen (Fashakin et al., 1986). Zuverlässige Referenz-miRNAs können durch

Algorithmen wie geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) und der vergleichenden delta-Ct-Methode (Silver et al., 2006) ermittelt werden, die die Stabilität von zellulären Nukleinsäuren anhand der Varianz der Ct-Werte unter den einzelnen experimentellen Bedingungen bewerten (Freitas et al., 2019).

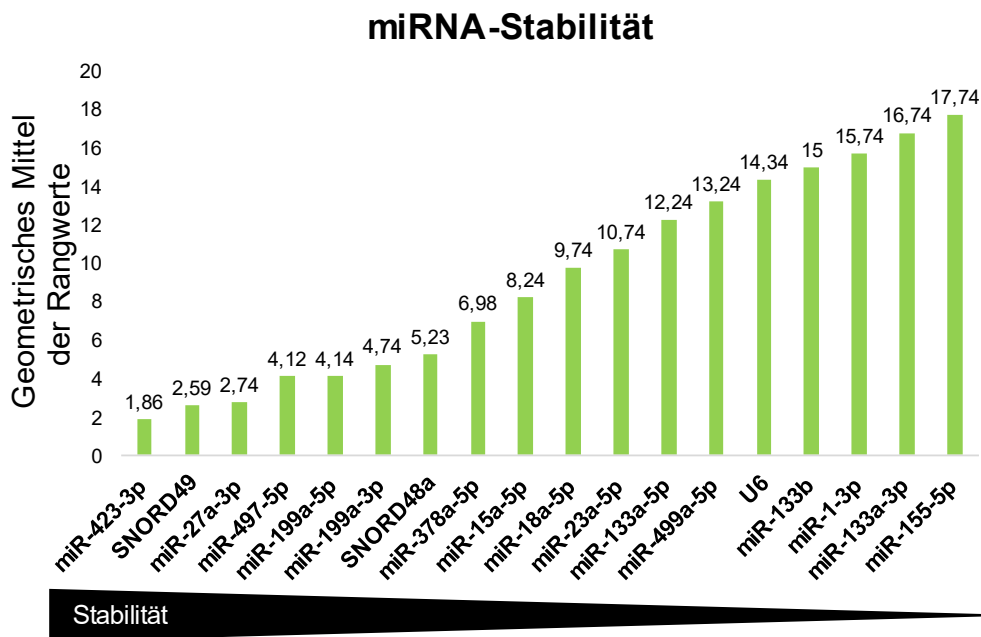
In dieser Arbeit wurden die geeigneten Referenz-miRNAs mit Hilfe des Programms RefFinder (Xie et al., 2012) analysiert. Dieses integriert die Ergebnisse der derzeit verfügbaren Berechnungsprogramme (geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), vergleichende delta-Ct-Methode (Silver et al., 2006)), um eine Rangfolge der untersuchten PCR-Produkte zu erstellen. Die miRNAs werden entsprechend den Ergebnissen dieser Programme gewichtet und das geometrische Mittel aus den Analysen gebildet. Je niedriger das geometrische Mittel ist, desto „stabiler“ wird die Expression dieser miRNA von RefFinder eingestuft.

Für diese Arbeit wurden miR-423-3p und SNORD49 als Referenz-miRNAs ausgewählt, die gemittelt über alle vier Algorithmen die zuverlässigsten Ergebnisse erzielten (s. Tabelle 14). Als dritte Referenz-miRNA wurde SNORD48a eingesetzt. Diese war in der von RefFinder erstellten Rangfolge im mittleren Bereich eingeordnet (s. Tabelle 14, Abbildung 20), jedoch zeigte sich in allen Programmen eine gute Stabilität dieser miRNA. NormFinder und geNorm wiesen einen Stabilitätsfaktor  $< 1$  auf. Je niedriger dieser Wert ist, desto größer ist die Stabilität des entsprechenden Moleküls in den analysierten Proben (Andersen et al., 2004; Sarker et al., 2018; Vandesompele et al., 2002). Das Programm BestKeeper ermittelt die Stabilität über die SD. Diese betrug 0,86, wobei ein Wert  $< 1$  für eine stabile Expression spricht (Köhler et al., 2020; Pfaffl et al., 2004). Des Weiteren wurde SNORD48a bei einer Vielzahl von Studien als Referenz-miRNA eingesetzt, die die trainingsinduzierte miRNA-Antwort im Skelettmuskel untersuchten (Davidsen et al., 2011; Margolis et al., 2017; Nielsen et al., 2010; Russell et al., 2013). Dies war ein weiteres Kriterium dafür, SNORD48a als dritte Referenz-miRNA in dieser Studie auszuwählen.

### Rangfolge stabil → weniger stabil

Methode	<b>1</b> miRNA	<b>2</b> miRNA	<b>3</b> miRNA	<b>4</b> miRNA	<b>5</b> miRNA
Delta-CT	-432-3p	-27a-3p	SNORD49	-497-5p	SNORD48a
BestKeeper	SNORD49	-27a-3p	-423-3p	-497-5p	SNORD48a
NormFinder	-423-3p	-27a-3p	SNORD49	-378a-5p	SNORD48a
geNorm	-199a-3p -199a-5p		-497-5p	-423-3p	SNORD49
<b>RefFinder</b>	<b>-423-3p</b>	<b>SNORD49</b>	<b>-27a-3p</b>	<b>-497-5p</b>	<b>-199a-5p</b>
Methode	<b>6</b> miRNA	<b>7</b> miRNA	<b>8</b> miRNA	<b>9</b> miRNA	<b>10</b> miRNA
Delta-CT	-199a-5p	-199a-3p	-15a-5p	-378a-5p	-18a-5p
BestKeeper	-378a-5p	-199a-5p	-199a-3p	-15a-5p	-18a-5p
NormFinder	-497-5p	-199a-5p	-15a-5p	-199a-3p	-18a-5p
geNorm	SNORD48a	-27a-3p	-15a-5p	-18a-5p	-23a-5p
<b>RefFinder</b>	<b>-199a-3p</b>	<b>SNORD48a</b>	<b>-378a-5p</b>	<b>-15a-5p</b>	<b>-18a-5p</b>
Methode	<b>11</b> miRNA	<b>12</b> miRNA	<b>13</b> miRNA	<b>14</b> miRNA	<b>15</b> miRNA
Delta-CT	-23a-5p	-133a-5p	-499a-5p	U6	-133b
BestKeeper	-23a-5p	-133a-5p	-499a-5p	-1-3p	-133b
NormFinder	-23a-5p	-133a-5p	-499a-5p	U6	-133b
geNorm	-378a-5p	U6	-133a-5p	-499a-5p	-133b
<b>RefFinder</b>	<b>-23a-5p</b>	<b>-133a-5p</b>	<b>-499a-5p</b>	<b>U6</b>	<b>-133b</b>
Methode	<b>16</b> miRNA	<b>17</b> miRNA	<b>18</b> miRNA		
Delta-CT	-1-3p	-133a-3p	-155-5p		
BestKeeper	-133a-3p	-155-5p	U6		
NormFinder	-1-3p	-133a-3p	-155-5p		
geNorm	-1-3p	-133a-3p	-155-5p		
<b>RefFinder</b>	<b>-1-3p</b>	<b>-133a-3p</b>	<b>-155-5p</b>		

**Tabelle 14 Stabilität der miRNAs unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen der qPCR-Analyse.** Das Programm RefFinder (Xie et al., 2012) erstellt eine Rangfolge der geeigneten Referenz-miRNAs basierend auf den Berechnungen der Algorithmen von geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) und vergleichender delta-Ct-Methode (Silver et al., 2006). Aufgelistet ist die Reihenfolge jedes Berechnungsprogramms sowie die daraus ermittelte Rangfolge von RefFinder. Die Stabilität der miRNAs nimmt von links nach rechts sowie von oben nach unten hin ab (miRNAs in der mit „1“ markierten Spalte: größte Stabilität; miRNAs in der mit „18“ markierten Spalte: niedrigste Stabilität).



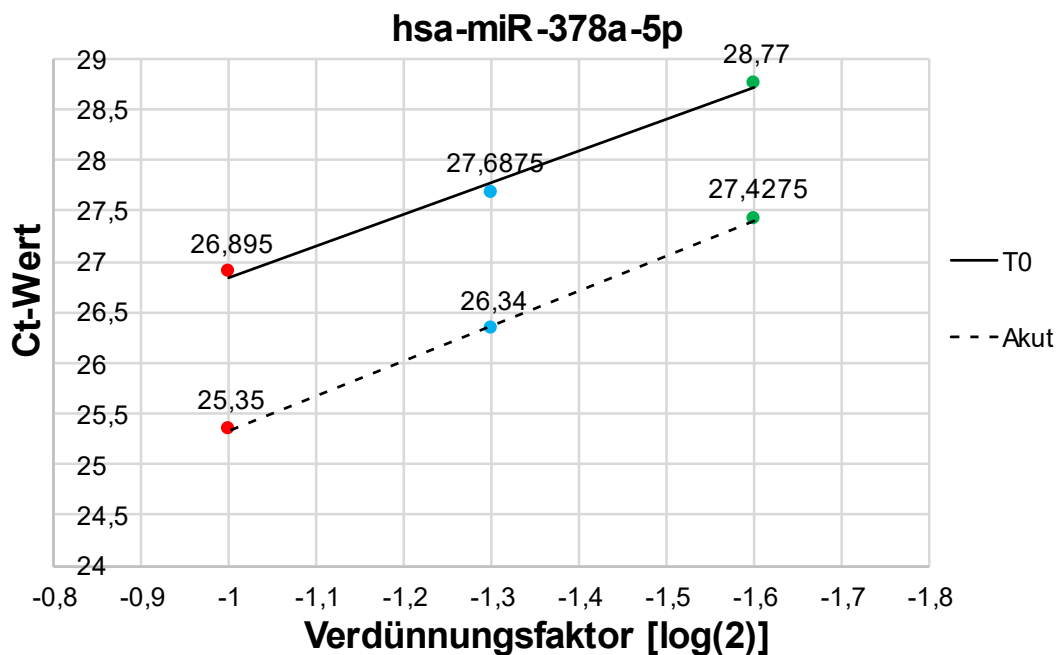
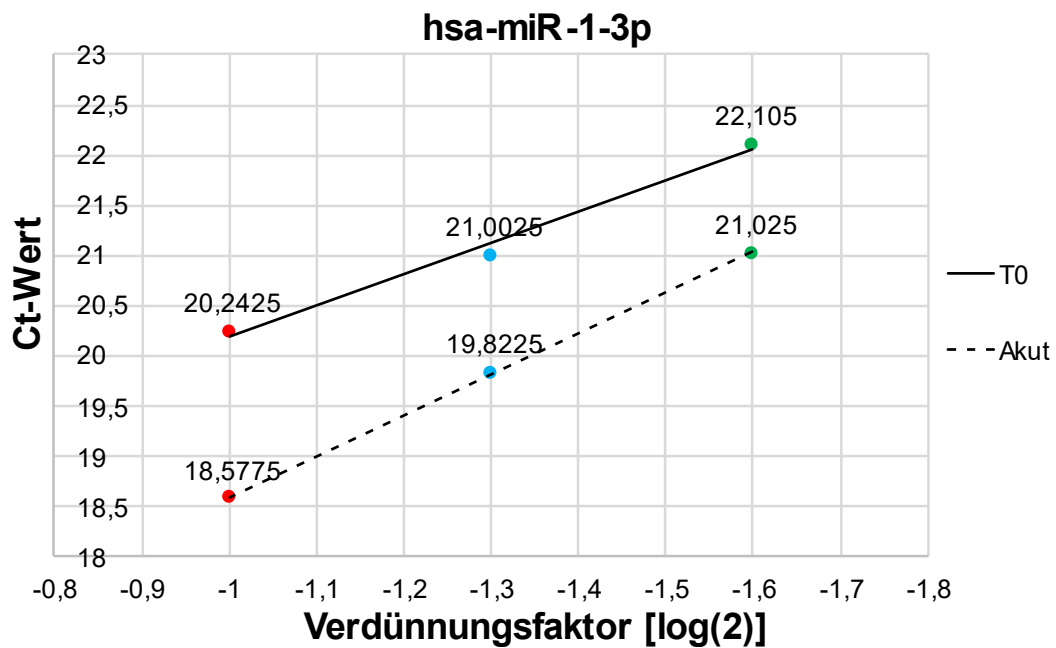
**Abbildung 20: Stabilität der analysierten miRNAs unter den gegebenen qPCR-Bedingungen gemäß dem Programm RefFinder.** Das Programm RefFinder (Xie et al., 2012) erstellt eine Rangfolge der geeigneten Referenz-miRNAs basierend auf den Berechnungen der Algorithmen von geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) und vergleichender delta-Ct-Methode (Silver et al., 2006). Dargestellt sind die miRNA-Spezies in Abhängigkeit des, von RefFinder berechneten, geometrischen Mittels der Rangwerte. Je niedriger das geometrische Mittel ist, desto stabiler wird die Expression der miRNA unter den gegebenen experimentellen Bedingungen von dem Programm RefFinder eingeschätzt und desto besser ist die Eignung dieser miRNA-Spezies als Referenz-miRNA.

### 3.2.3 Bestimmung der optimal einzusetzenden cDNA-Menge für die qPCR-Experimente

Der Hersteller des miRCURY LNA miRNA PCR Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland) empfiehlt bei der Verwendung dieses Systems 3 µl der Ziel-cDNA mit einer Konzentration von 1:60 einzusetzen. Da in unserem Labor vor Beginn dieser Arbeit nicht mit dieser Technik gearbeitet worden war, wurde vor Beginn der qPCR-Experimente eine dreistufige Verdünnungsreihe mit den Faktoren 1:10, 1:20 und 1:40 angelegt, um die optimal einzusetzenden cDNA-Menge für die in dieser Studie verwendeten Skelettmuskelproben zu ermitteln. Anhand der Mikroarray-Daten wurde eine bei allen Probandinnen stark (miR-1(-3p)) sowie eine schwach (miR-378a-5p) exprimierte miRNA ausgewählt, deren qPCR-Profil

in den Proben zweier Testpersonen (IR0008, IR0030) mittels Verdünnungsreihe genauer analysiert wurden.

Für beide miRNA-Spezies zeigte sich eine lineare Zunahme der Ct-Werte (Pearson's  $r > 0,990$ ) zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen. Die Fluoreszenzintensität der miR-1-3p-Amplifikation überstieg den Schwellenwert  $t$  zwischen dem 18. und 23. Zyklus. Das Fluoreszenzsignal der miR-378a-5p-Amplifikation hingegen konnte erst zwischen dem 25. und 29. Zyklus detektiert werden (s. Abbildung 21). Da mit steigender Zyklusanzahl die Amplifikationseffizienz sinkt und zunehmend unspezifische PCR-Produkte entstehen, wurde für die qPCR-Experimente in dieser Arbeit ein Verdünnungsfaktor von 1:10 gewählt, damit auch niedrig exprimierte miRNAs zuverlässig detektiert werden konnten.



**Abbildung 21: Verdünnungsreihe von miR-1-3p und miR-378a-5p.** Dargestellt ist der Ct-Wert (y-Achse) in Abhängigkeit vom Verdünnungsfaktor, der logarithmisch auf der x-Achse aufgetragen ist. Zur Validierung des optimalen Verdünnungsfaktors wurde die Ziel-cDNA mit den Faktoren 1:10 (rot), 1:20 (blau) und 1:40 (grün) mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Bereits bei der niedrigsten Verdünnungsstufe wird das Fluoreszenzsignal von miR-378a-5p erst zwischen dem 25. und 27. PCR-Zyklus detektiert, weshalb für die vorliegende Studie eine 1:10-Verdünnung für alle qPCR-Experimente gewählt wurde. Hsa-: *Homo sapiens*; Ct: *Cycle Threshold*; T0: Zeitpunkt vor Beginn der Trainingsintervention; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3).



### **3.2.4 Evaluation der Kongruenz zwischen den qPCR- und Mikroarray-Daten**

Da die Mikroarray-Analyse die Grundlage für die Planung der weiteren qPCR-Experimente bildete, wurde zunächst überprüft, inwieweit die Mikroarray-Daten mit der LNA-qPCR-Technologie reproduzierbar sind. Die Übereinstimmung zwischen Mikroarray- und qPCR-Ergebnissen wurde für die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen 19 miRNAs analysiert. Eine perfekte Übereinstimmung war dabei aufgrund der Unterschiede in der Empfindlichkeit und im dynamischen Bereich zwischen den beiden Techniken nicht zu erwarten. Es wurde jedoch eine gute Gesamtkongruenz von 73,33 % für die differentielle miRNA-Regulation festgestellt, d. h. die mittels Mikroarray-Technologie ermittelte mittlere *Fold change* für eine bestimmte miRNA stimmte bezüglich ihrer Richtung (Induktion/Repression) mit dem Durchschnittswert der in der qPCR ermittelten Regulationsrichtung überein (s. Tabelle 15). Mit beiden Techniken konnte dabei eine signifikante Reduktion von miR-27a-3p, miR-199a-5p sowie miR-378a-5p detektiert werden. Eine signifikante Abnahme in der Mikroarray-Untersuchung, jedoch nichtsignifikante Reduktion in der qPCR-Analyse, zeigte sich für miR-1 bzw. miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b, miR-499a-5p, miR-15a-5p, miR-132-3p, miR-199a-3p und miR-497-5p. Inkongruente Ergebnisse lieferte die Analyse von miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-133a-5p sowie miR-155-5p (s. Tabelle 15). Die vier miRNAs miR-23a-5p, miR-4330, miR-4743-5p und miR-7151-3p konnten auf Grund der Anhäufung unspezifischer Fluoreszenzsignale mittels qPCR nicht verlässlich quantifiziert werden (s. Kapitel 3.2.5, Abbildung 39) und wurden daher aus der Analyse ausgeschlossen.

Anhand des Konkordanz-Maß  $\gamma$  wurde die individuelle Übereinstimmung der miRNA-Aktmuster für die einzelnen Probandinnen und je miRNA überprüft. Ein  $\gamma$  von +1 spricht hierbei für eine perfekte Konkordanz der Paare, ein  $\gamma$  von -1 für eine Diskordanz aller Werte. Es bestätigte sich die bereits oben beschriebene im Mittel gegensätzliche Regulation von miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-133a-5p sowie miR-155-5p mit primär diskordanten Werten ( $\gamma < 0$ ). Darüber hinaus errechnete sich auch für miR-15a-5p ein negatives Konkordanz-Maß ( $\gamma = -0,66$ ) (s. Abbildung 22d).

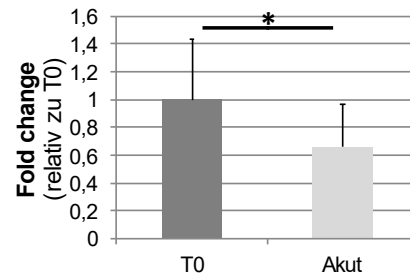
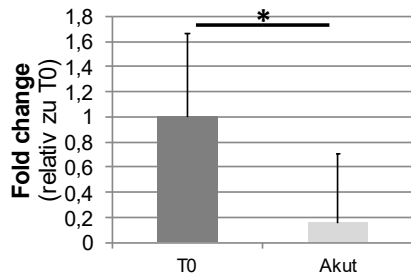
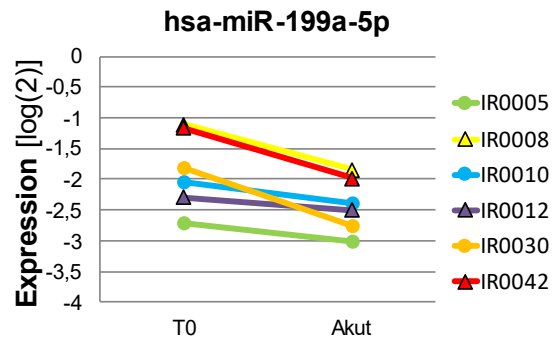
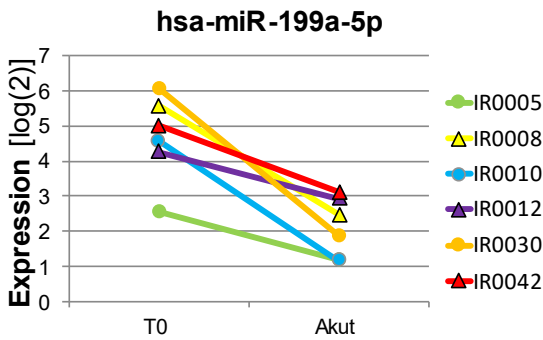
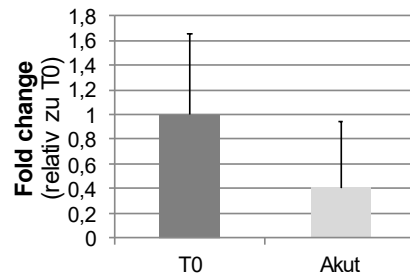
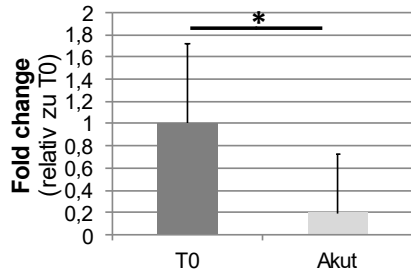
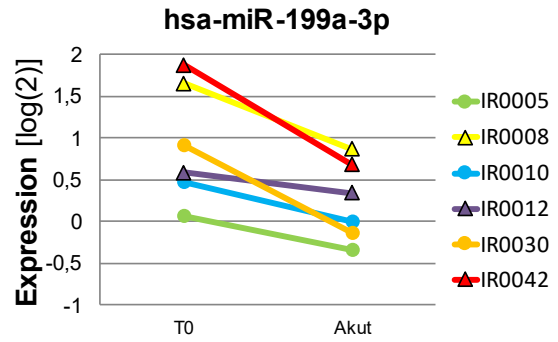
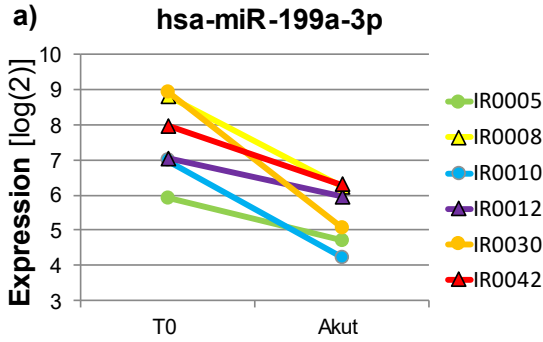
Acht miRNAs zeigten kongruente Daten, wobei eine perfekte Konkordanz von +1 für miR-199a-3p und -5p erzielt wurde (s. Abbildung 22a, b). Die Werte für miR-133b und miR-497-5p zeigten keinen statistischen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen beider Methoden ( $\gamma = 0$ ) (s. Abbildung 22c).

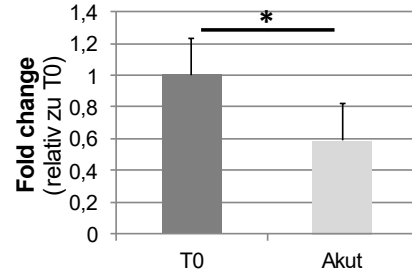
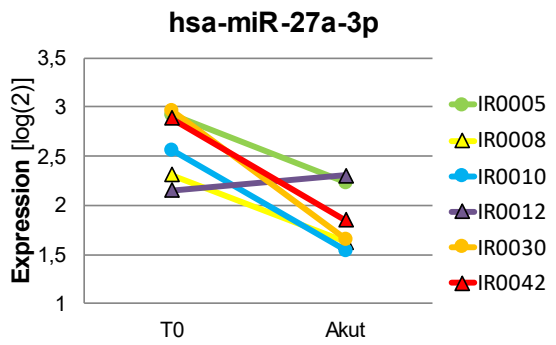
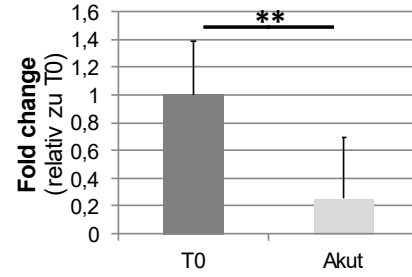
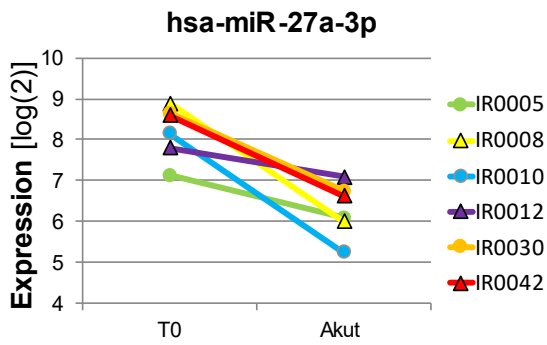
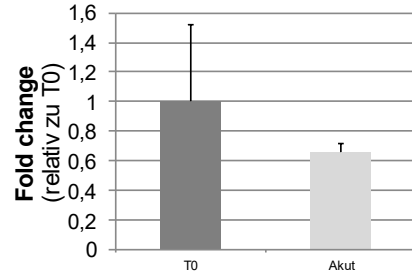
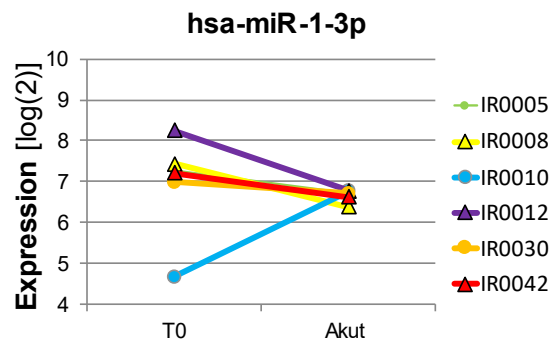
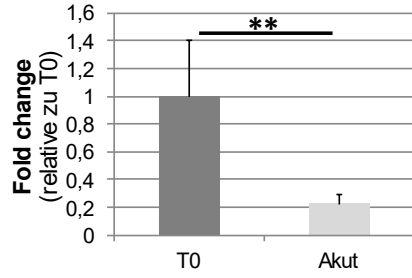
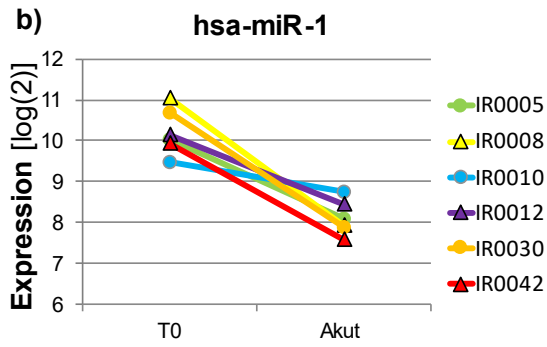
miRNA	Mikroarray		qPCR		Konkordanz		
	<i>Fold change</i>	p-Wert	<i>Fold change</i>	p-Wert	K	D	$\gamma$
-1 / -1-3p	-4,91	0,008	-1,54	0,203	5	1	0,66
-133a-3p	-2,34	0,041	-4,07	0,078	4	2	0,33
-133a-5p	-4,54	0,006	+1,21	0,032	1	5	-0,66
-133b	-2,76	0,011	-1,45	0,565	3	3	0
-499a-5p	-7,61	0,046	-1,33	0,249	4	2	0,33
-15a-5p	-5,12	0,021	-1,16	0,462	1	5	-0,66
-18a-5p	-7,39	0,028	1,0	0,576	1	5	-0,66
-19b-3p	-5,33	0,032	-1,04	0,45	2	4	-0,33
-27a-3p	-4,64	0,007	-1,78	0,016	5	1	0,66
-132-3p	+6,46	0,028	+1,27	0,614	4	2	0,33
-155-5p	+7,32	0,028	-1,16	0,731	2	4	-0,33
-199a-3p	-5,8	0,035	-3,78	0,127	6	0	1
-199a-5p	-7,69	0,026	-1,49	0,023	6	0	1
-378a-5p	-1,99	0,018	-1,29	0,01	5	1	0,66
-497-5p	-6,46	0,043	-1,29	0,206	3	3	0

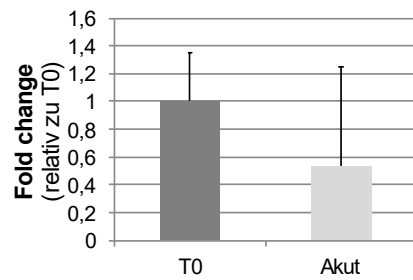
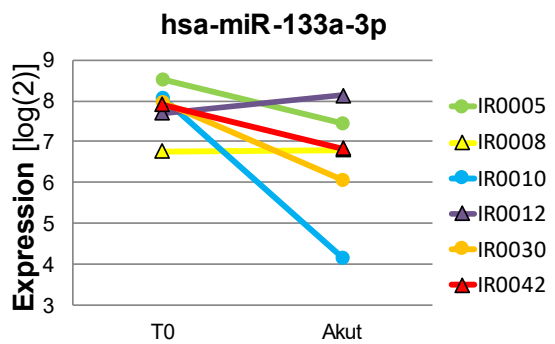
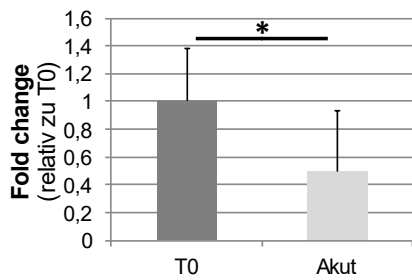
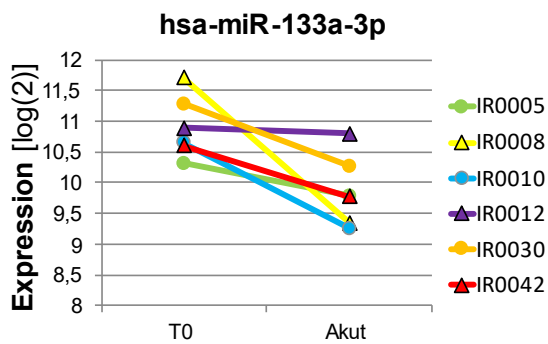
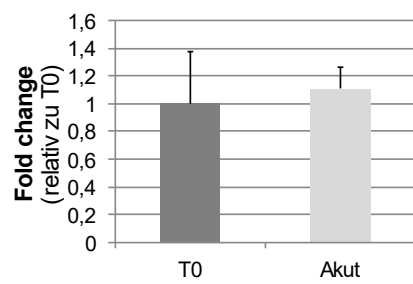
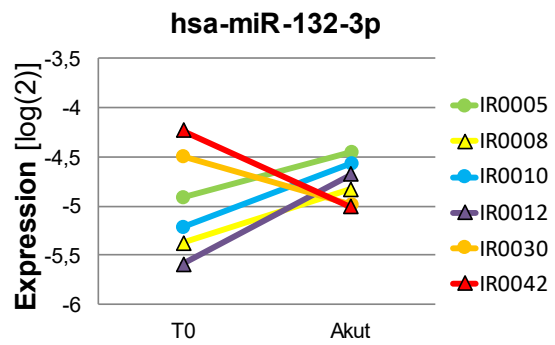
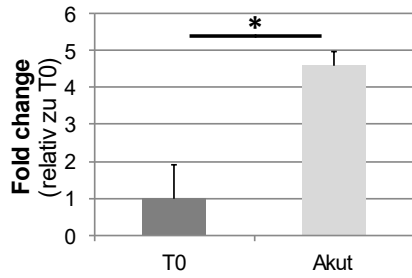
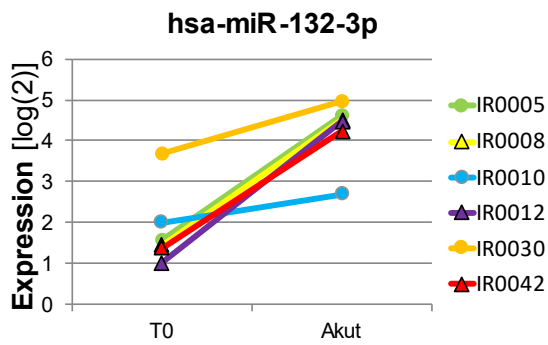
**Tabelle 15: Vergleich der Konkordanz der Mikroarray- und der qPCR-Ergebnisse.** Grün markiert sind konkordante Paare, rot markiert sind diskordante Paare. Ein konkordantes Paar weist hierbei in der qPCR- und Mikroarray-Analyse dieselbe Regulationsrichtung (Induktion/Repression), ein diskordantes Paar eine gegensätzliche Regulation bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur auf. K: Anzahl konkordanter Paare; D: Anzahl diskordanter Paare;  $\gamma$ : Konkordanz-Maß;  $\gamma = (K - D) / (K + D)$ . Perfekte Konkordanz:  $\gamma = +1$ ; vollständige Diskordanz:  $\gamma = -1$ ; kein statistischer Zusammenhang:  $\gamma = 0$ .

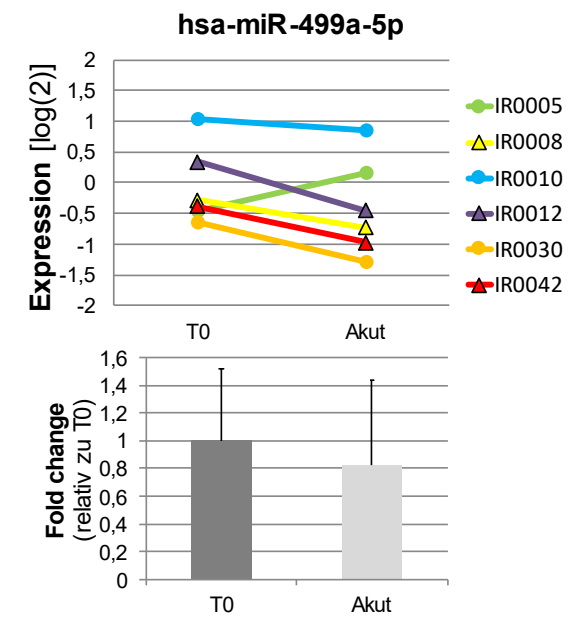
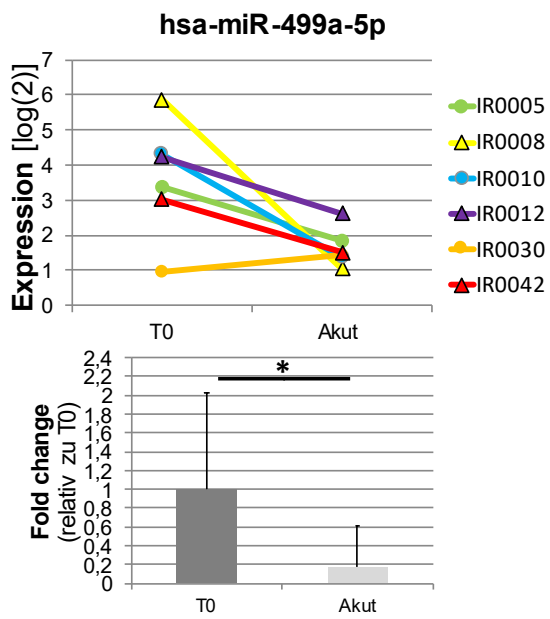
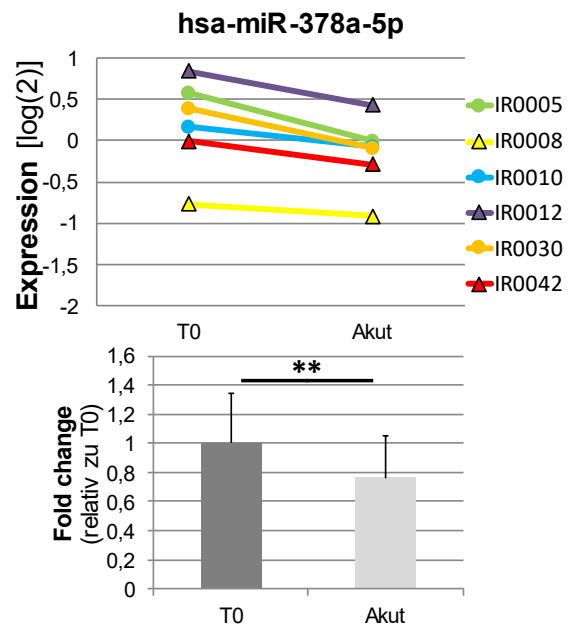
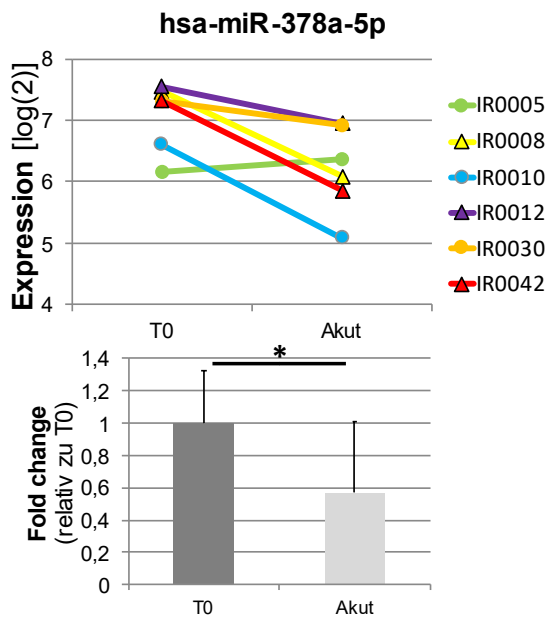
Mikroarray-Daten

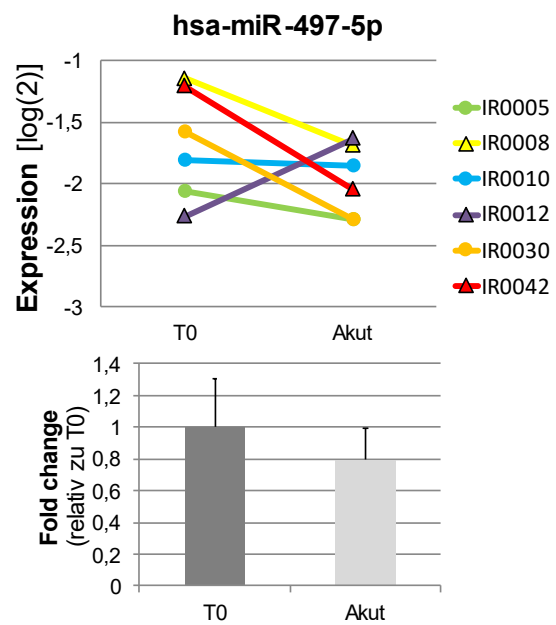
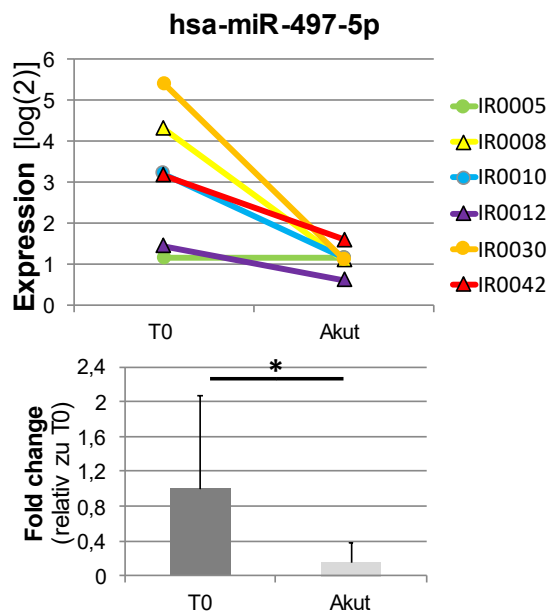
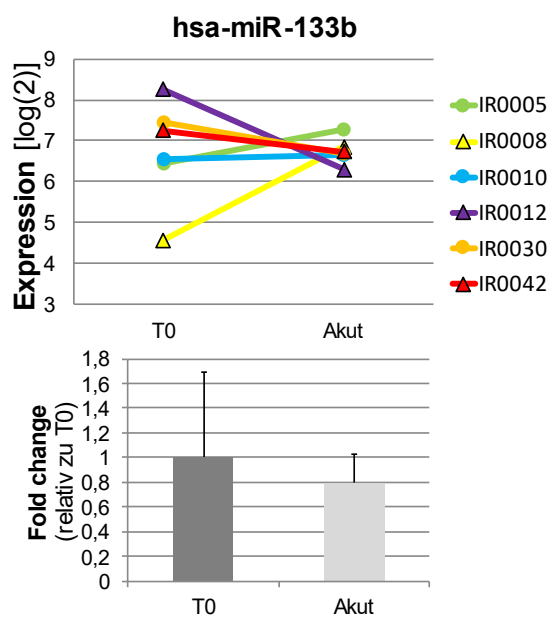
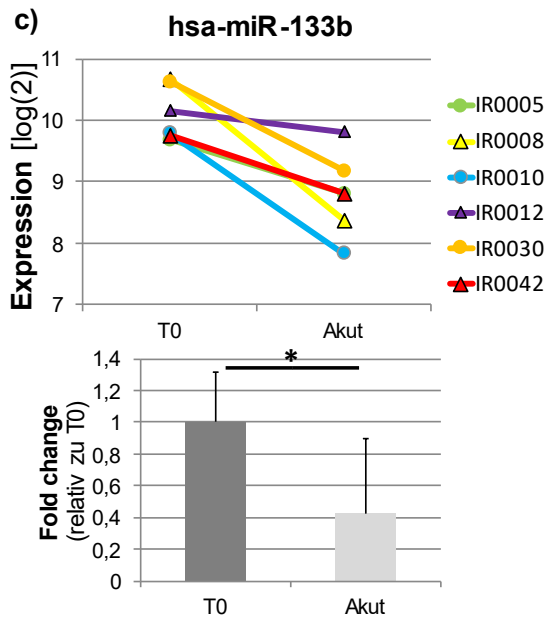
qPCR-Daten

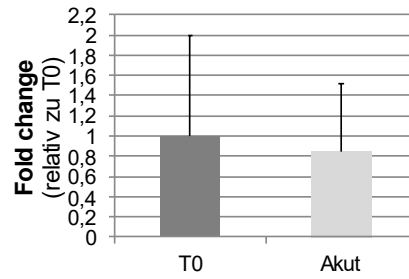
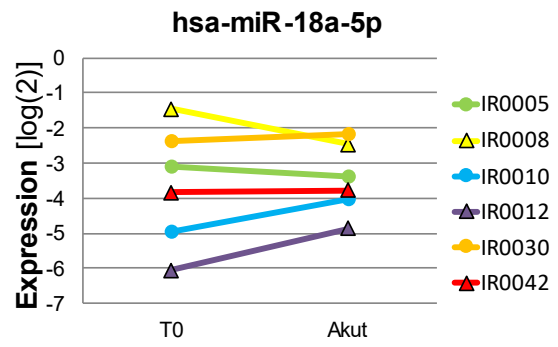
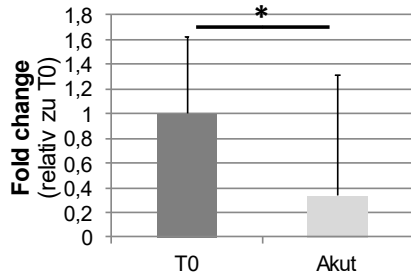
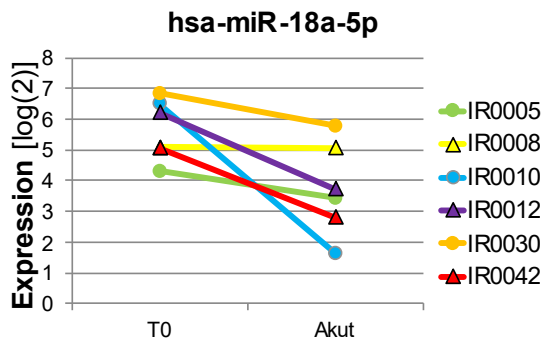
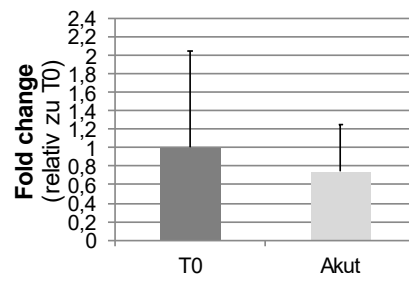
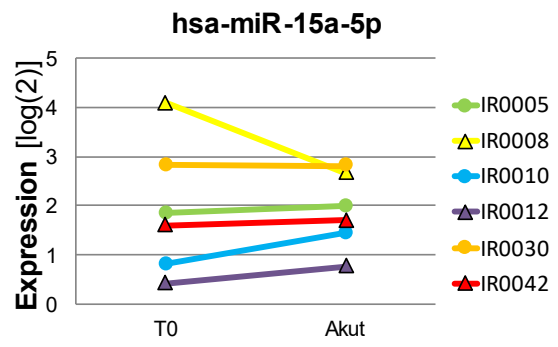
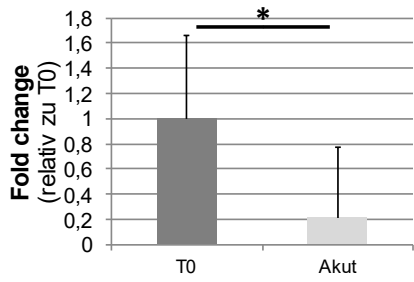
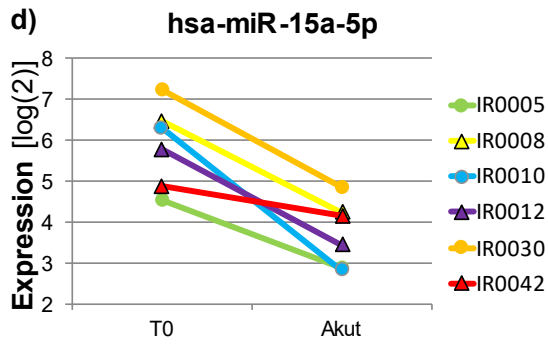




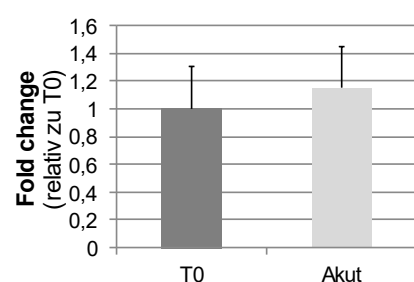
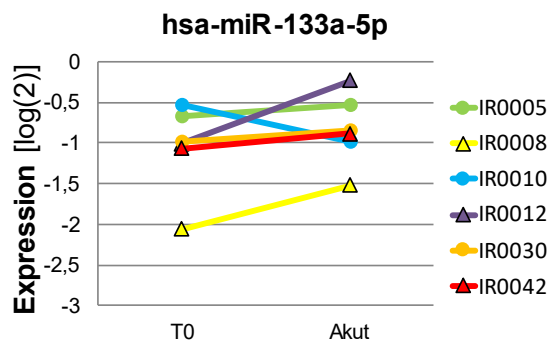
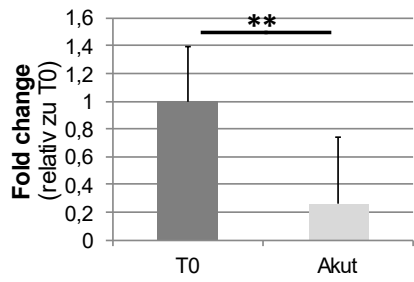
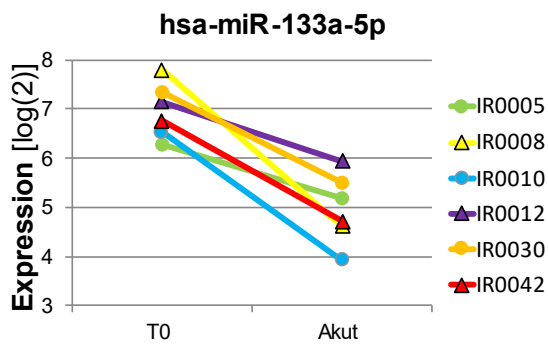
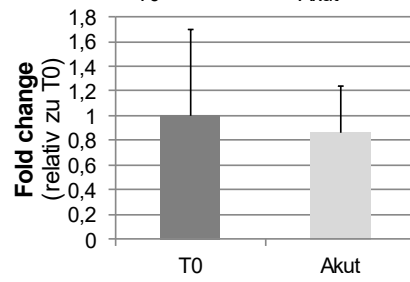
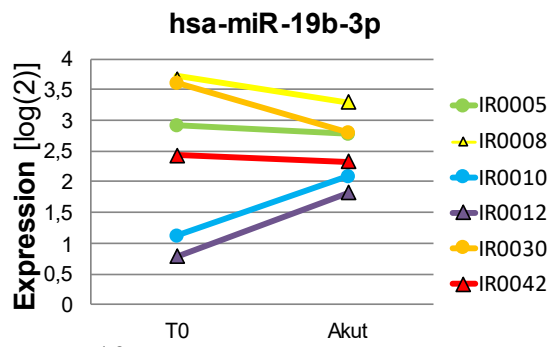
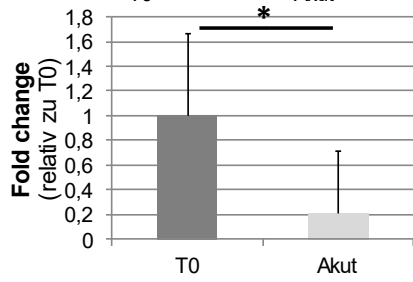
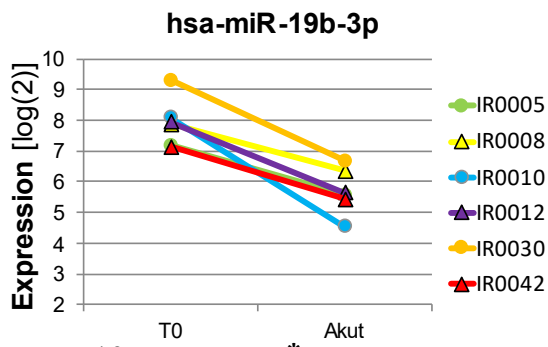


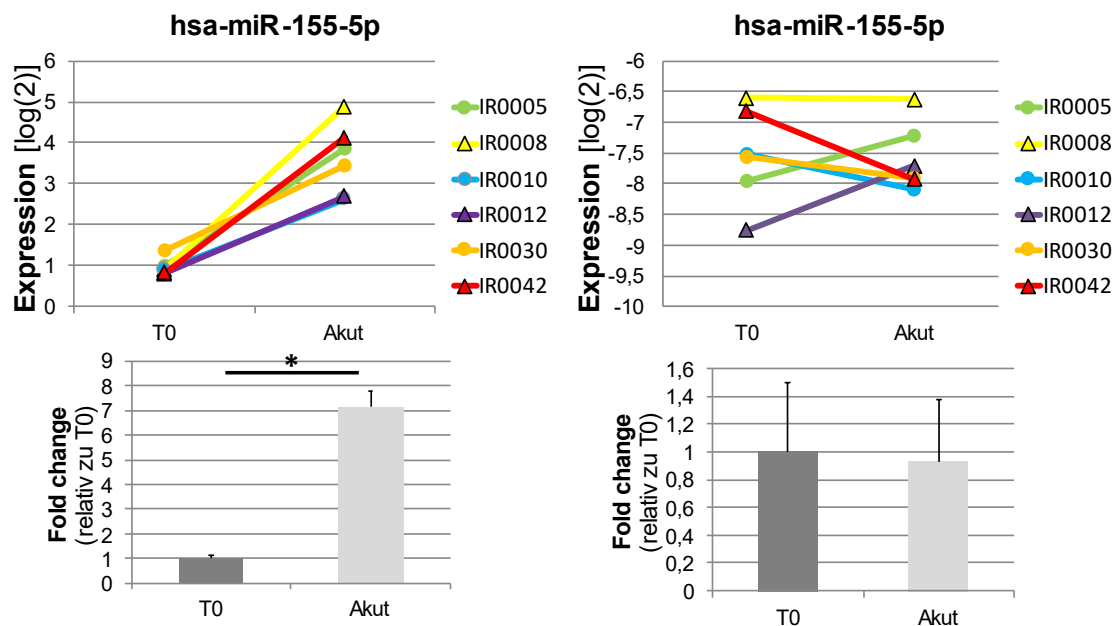












**Abbildung 22: Konkordanz zwischen den Mikroarray- und den qPCR-Daten.** Linke Spalte: Mikroarray-Daten. Rechte Spalte: qPCR-Daten. Dargestellt ist die Veränderung der miRNA-Expression zwischen den Zeitpunkten T0 und T<sub>Akut</sub> (n = 6). Diese ist für jede miRNA im *Logarithmus dualis* (obere Graphik) sowie relativ zu T0 (untere Graphik) abgebildet. a) miRNAs mit  $\gamma = +1$ ; b) miRNAs mit  $\gamma = (0; 1)$ ; c) miRNAs mit  $\gamma = 0$ ; d) miRNAs mit  $\gamma < 0$ . Konkordanz-Maß  $\gamma = (K - D) / (K + D)$ . Perfekte Konkordanz:  $\gamma = +1$ ; vollständige Diskordanz:  $\gamma = -1$ ; kein statistischer Zusammenhang:  $\gamma = 0$ . Kreise markieren Probandinnen, die zunächst das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). Diese Unterscheidung wird in der Analyse möglicher Korrelationen zwischen dem miRNA-Akutmuster und den Veränderungen der physiologischen Parameter nach Abschluss der Trainingsblöcke relevant (s. Kapitel 3.3). IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; hsa-: *Homo sapiens*; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

### 3.2.5 Veränderung der miRNA-Muster bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur in der Gesamtkohorte

Mittels qPCR wurden die 15 miRNAs, die im vorangehenden Abschnitt beschrieben wurden, hinsichtlich ihrer Veränderungen bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur in einem größeren Kollektiv (n = 29) untersucht.

In Einklang mit den Mikroarray-Ergebnissen und den qPCR-Daten der initial analysierten sechs Probandinnen zeigte sich eine Überlegenheit an miRNAs, die durch einen akuten Belastungsreiz reprimiert wurden. Dreizehn der analysierten miRNAs wiesen dabei in beiden Analysen im Mittel eine Abnahme ihrer

Expression auf (miR-1-3p, miR-15a-5p, miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p/-5p, miR-133b, miR-199a-3p/-5p, miR-378a-5p, miR-497-5p, miR-499a-5p). Eine deutliche Induktion zeigte sich lediglich für miR-155-5p, wohingegen miR-132-3p keine wesentliche Veränderung bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur aufwies (s. Abbildung 23 – 37).

Die Analyse der muskelspezifischen miRNAs bestätigte dabei die bereits im Mikroarray und in der initialen qPCR-Analyse (n = 6) detektierte Reduktion der miRNA-Expression, mit einer (hoch)signifikanten Abnahme von miR-1-3p (*Fold change*: -8,64; p = 0,000\*\*), miR-133a-3p (*Fold change*: -7,56; p = 0,000\*\*), miR-133b (*Fold change*: -7,28; p = 0,002\*\*), miR-499a-5p (*Fold change*: -5,24; p = 0,000\*\*) sowie miR-133a-5p (*Fold change*: -3,64; p = 0,034\*) (s. Tabelle 16, Abbildung 23 - 27). Interessanterweise wiesen die Probandinnen mit der Versuchspersonen-Identifikationsnummer IR0040, IR0048, IR0049, IR0051 und IR0054 eine überdurchschnittlich starke Regulation dieser miRNAs mit einer 12- bis 25fach höheren *Fold change* verglichen mit dem übrigen Kollektiv auf. Dies deutet auf starke interindividuelle belastungsinduzierte Unterschiede bezüglich des miRNA-Akutmusters hin. Die Veränderungen der Expression von miR-1-3p, miR-133a-3p/-5p, miR-133b und miR-499a-5p zeigten darüber hinaus eine hochsignifikante Korrelation untereinander ( $r = > 0,8$ ) sowie mit der  $\Delta$ miR-378a-5p ( $r = > 0,8$ ) (s. Tabelle 17).

Eine (hoch)signifikante belastungsinduzierte Abnahme der miRNA-Expression wurde zudem für miR-27a-3p (*Fold change*: -2,12; p = 0,000\*\*), miR-378a-5p (*Fold change*: -3,33; p = 0,000\*\*), miR-199a-3p (*Fold change*: -2,41; p = 0,015\*), miR-199a-5p (*Fold change*: -1,77; p = 0,000\*\*) sowie miR-497-5p (*Fold change*: -1,78; p = 0,000\*\*) detektiert (s. Tabelle 16, Abbildung 28 - 32). Hierbei fiel eine hochsignifikante Korrelation zwischen den durch eine akute aerobe Belastung induzierten Veränderungen der Expression von miR-497-5p und miR-199a-5p ( $r = 0,683$ ) sowie von miR-497-5p und miR-27a-3p ( $r = 0,511$ ) auf (s. Tabelle 17).

Die drei miRNAs miR-15a-5p, miR-18a-5p sowie miR-19b-3p waren in der Konkordanz-Analyse durch die diskordante Regulation im Vergleich zwischen

Mikroarray- und qPCR-Daten ( $n = 6$ ) aufgefallen (s. Kapitel 3.2.4, Tabelle 15). Bei der Untersuchung des gesamten Kollektivs ( $n = 29$ ) wies miR-19b-3p jedoch in Einklang mit den Mikroarray-Daten eine signifikante Reduktion auf (*Fold change*: -1,7;  $p = 0,015^*$ ), und auch miR-15a-5p sowie miR-18a-5p zeigten, wie bereits im Mikroarray detektiert, eine belastungsinduzierte Repression, welche jedoch nicht signifikant war (*Fold change*: -1,48;  $p = 0,09$  bzw. *Fold change*: -1,59;  $p = 0,222$ ) (s. Tabelle 16, Abbildung 33 - 35). Des Weiteren fiel auf, dass individuell betrachtet lediglich die Hälfte der Probandinnen eine Expressionsabnahme dieser miRNAs zeigte (miR-15a-5p 52 %, miR-18a-5p 45 %, miR-19b-3p 61 %), wohingegen im übrigen Kollektiv keine Reduktion zu beobachten war. Interessanterweise korrelierten zudem die Veränderungen der Expression dieser drei miRNAs hochsignifikant miteinander (s. Tabelle 17).

In der Mikroarray-Analyse war für miR-132-3p (*Fold change*: 6,46;  $p = 0,028^*$ ) sowie miR-155-5p (*Fold change*: 7,32;  $p = 0,028^*$ ) eine signifikante Induktion nachgewiesen worden, welche in der initialen qPCR-Analyse ( $n = 6$ ) zunächst nicht hatte bestätigt werden können (s. Kapitel 3.2.4, Tabelle 15). In der qPCR-Analyse des gesamten Kollektivs ( $n = 29$ ) wies miR-155-5p dann jedoch ebenfalls eine (hoch)signifikante Zunahme auf (*Fold change*: 2,91;  $p = 0,001^{**}$ ), wodurch die Mikroarray-Ergebnisse bestätigt wurden. Die Expression von miR-132-3p stieg hingegen nur geringfügig und nichtsignifikant an (*Fold change*: 1,3;  $p = 0,275$ ) (s. Tabelle 16, Abbildung 36 und 37).

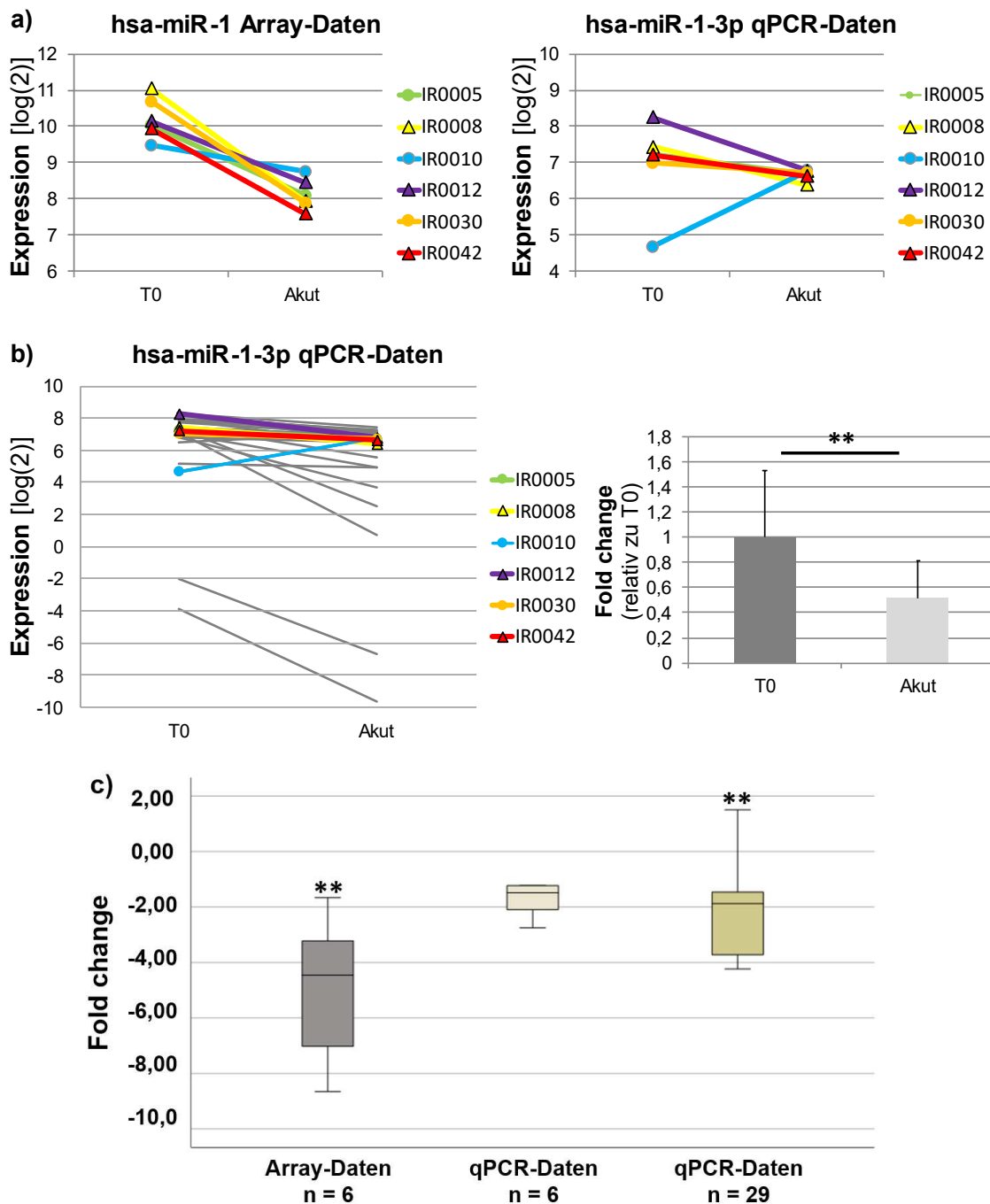
miRNA	Fold change	p-Wert	
-1-3p	-8,64	0,000	**
-133a-3p	-7,56	0,000	**
-133a-5p	-3,64	0,034	*
-133b	-7,28	0,002	**
-499a-5p	-5,24	0,000	**
-27a-3p	-2,12	0,000	**
-378a-5p	-3,33	0,000	**
-199a-3p	-2,41	0,015	*
-199a-5p	-1,77	0,000	**
-497-5p	-1,78	0,000	**
-15a-5p	-1,48	0,09	n. s.
-18a-5p	-1,59	0,222	n. s.
-19b-3p	-1,7	0,015	*
-132-3p	+1,3	0,275	n. s.
-155-5p	+2,92	0,001	**

**Tabelle 16: Fold changes und p-Werte der qPCR-Analyse.** Fünfzehn miRNAs wurden in qPCR-Experimenten in einem größeren Kollektiv (n = 29) ausgewertet. Dreizehn miRNAs wiesen hierbei eine Abnahme ihrer Expression bei der Akutantwort auf, miR-155-5p zeigte als einzige miRNA eine deutliche Induktion, und miR-132-3p wies keine wesentliche Regulation bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur auf. Das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung der Expression; n. s: nichtsignifikant.

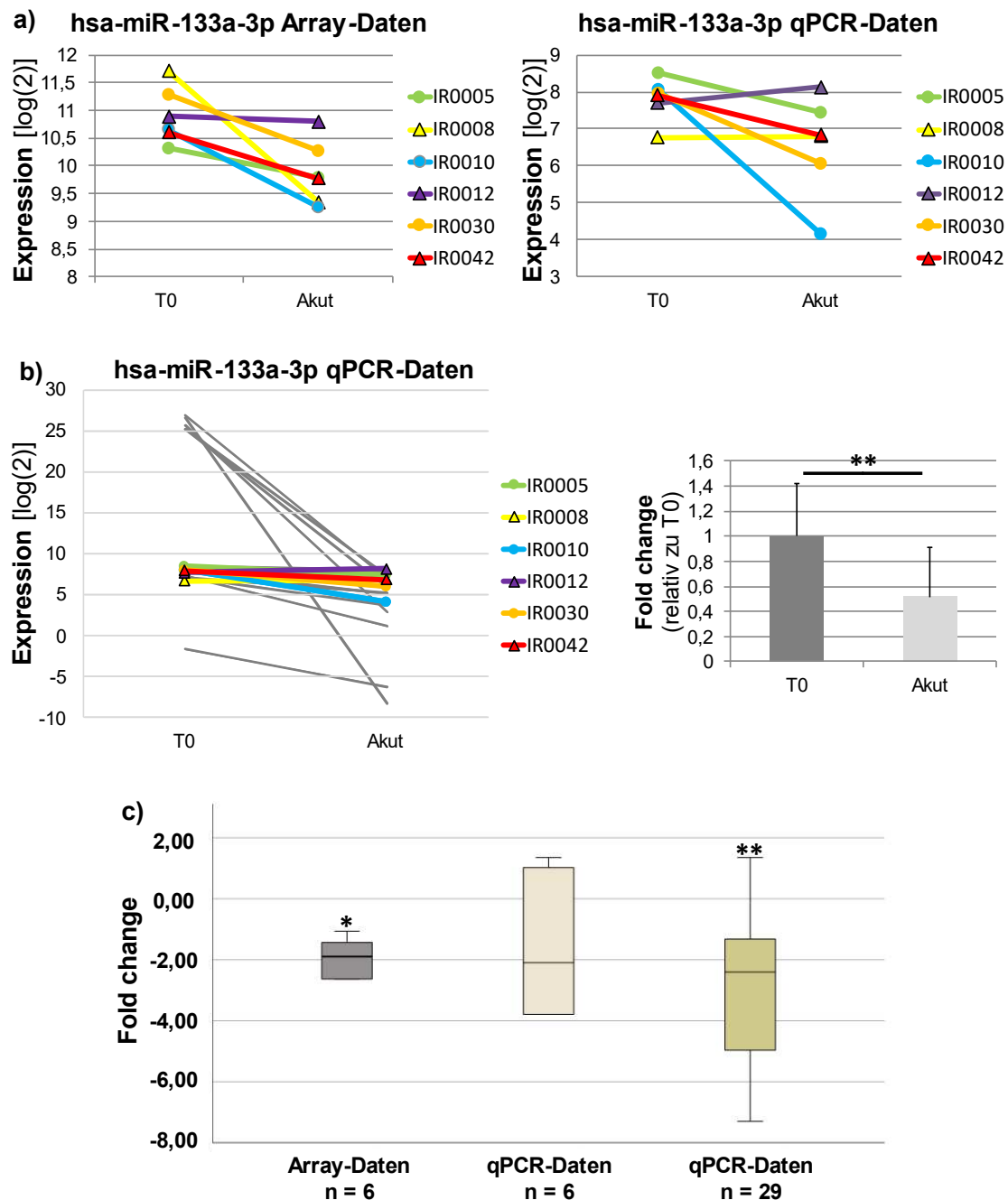
miRNA	133a-3p	133a-5p	133b	499a-5p	378a-5p	199a-5p	27a-3p	18a-5p	19b-3p
<b>1-3p</b>	,921	,965	,942	,819	,838				
<b>133a-3p</b>		,947	,956	,924	,878				
<b>133a-5p</b>			,958	,981	,946				
<b>133b</b>				,847	,840				
<b>497-5p</b>						,683	,511		
<b>15a-5p</b>								,683	,511
<b>18a-5p</b>									,767

**Tabelle 17: Korrelation zwischen den Veränderungen der belastungsinduzierten Akutmuster verschiedener miRNAs.** Dargestellt sind alle starken ( $|r| \geq 0,3$ ), hochsignifikanten ( $p \leq 0,01$ ) Korrelationen zwischen den durch eine akute aerobe Belastung induzierten Veränderungen der Expression einzelner miRNAs.

In den Abbildungen 24 - 37 sind die Mikroarray- und qPCR-Daten aller miRNAs, die in qPCR-Experimenten analysiert wurden, graphisch dargestellt. Die Abbildung (a) zeigt die Veränderung der Expression der jeweiligen miRNA bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur im *Logarithmus dualis* sowie relativ zu T0 in den sechs Probandinnen, deren Akutmuster initial mittels Mikroarray-Technik untersucht wurden. Die Mikroarray- und qPCR-Daten sind hierbei vergleichend gegenübergestellt (n = 6). In Abbildung (b) sind die Ergebnisse der qPCR-Experimente des gesamten Kollektivs (n = 29) dargestellt und in Abbildung (c) sind die detektierten *Fold changes* der Mikroarray- und qPCR-Untersuchung in Box-Plots gegenübergestellt. Für eine bessere Übersicht der Box-Plots sind Ausreißer und Extremwerte nicht abgebildet. Ausreißer und Extremwerte sind hierbei definiert als Werte, die mehr als den 1,5fachen bzw. 2,5fachen Interquartilabstand vom ersten oder dritten Quartil entfernt liegen.

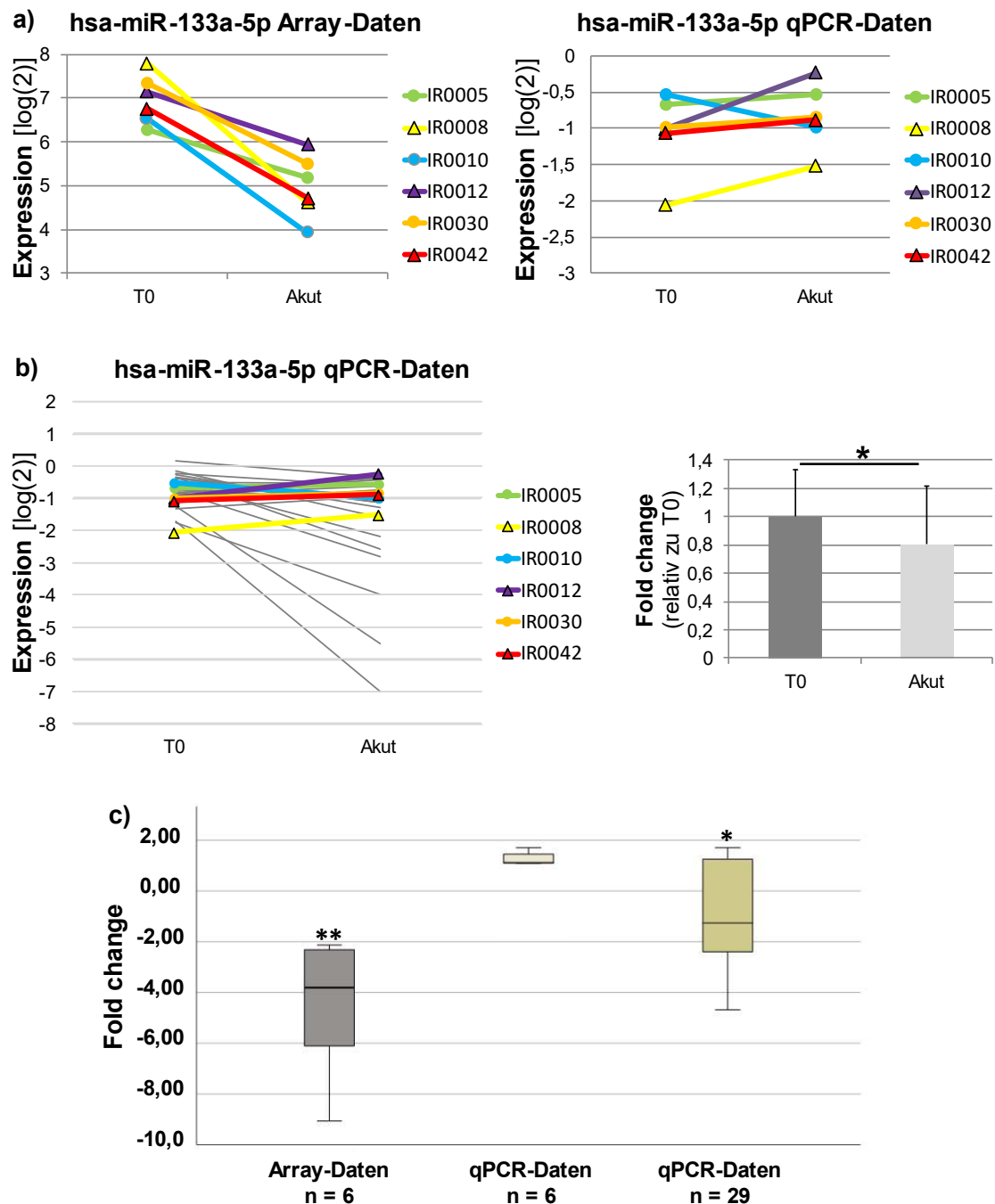


**Abbildung 23: Veränderung von miR-1-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*\*) markiert eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

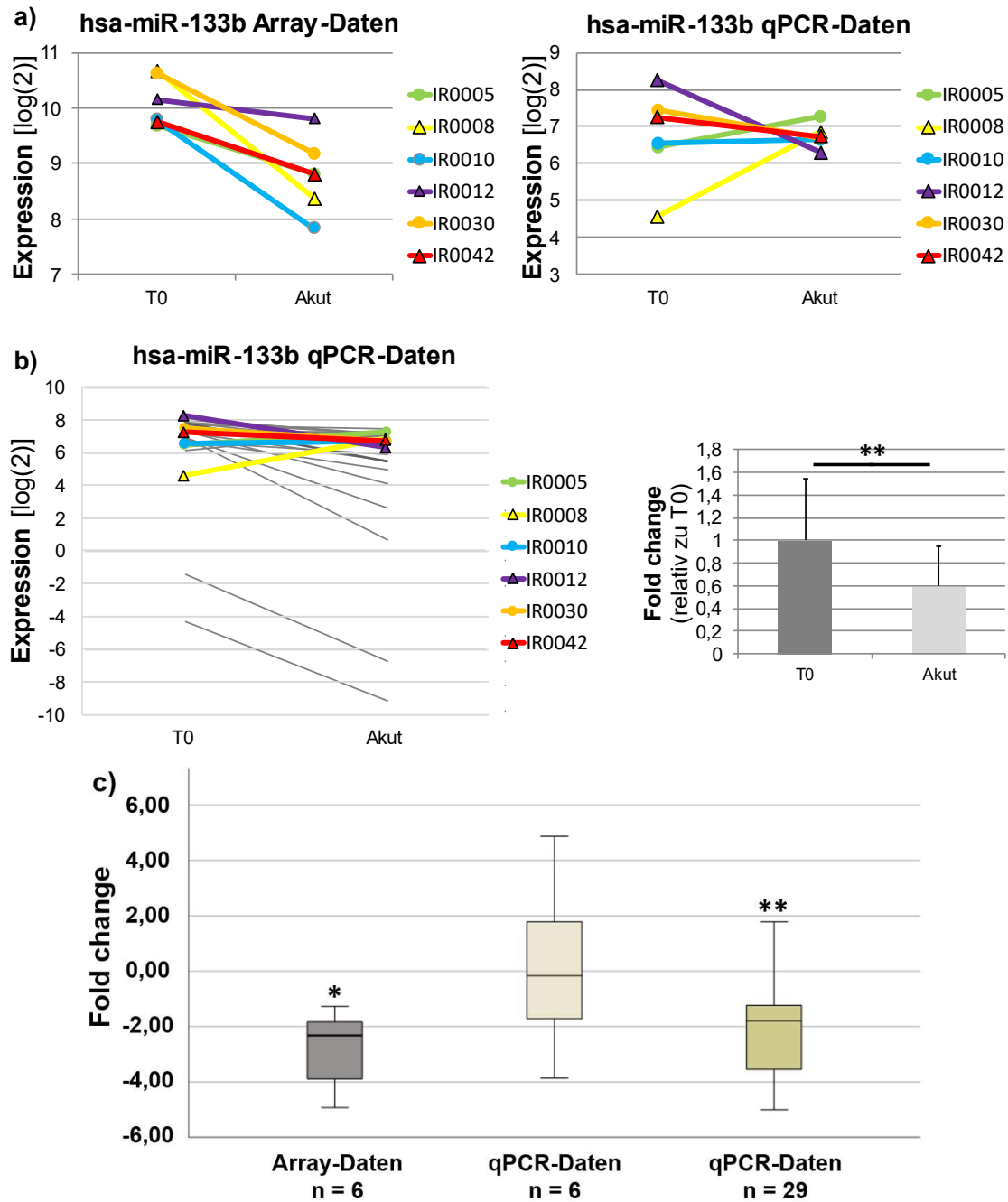


**Abbildung 24** Veränderung von miR-133a-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur. a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

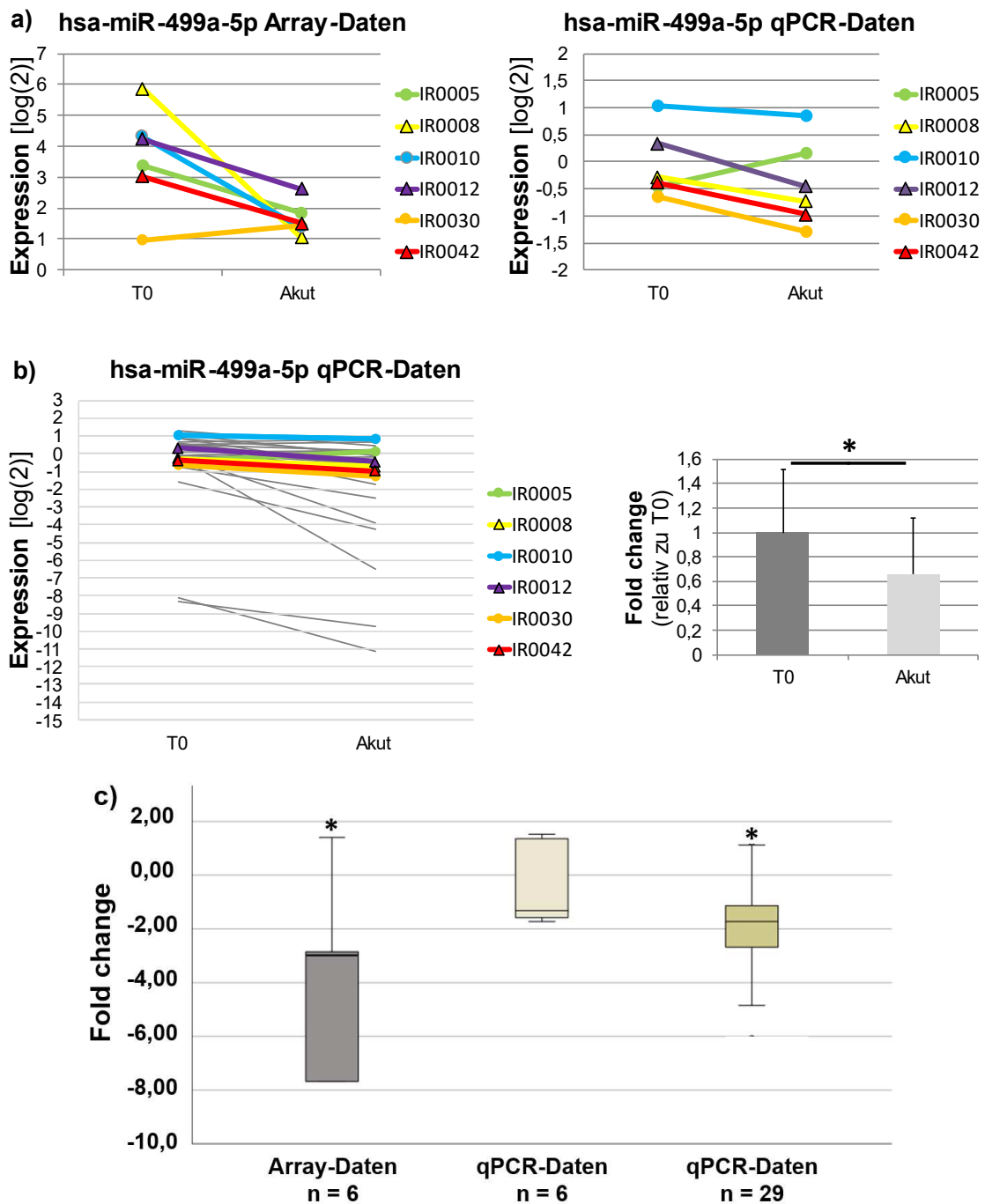




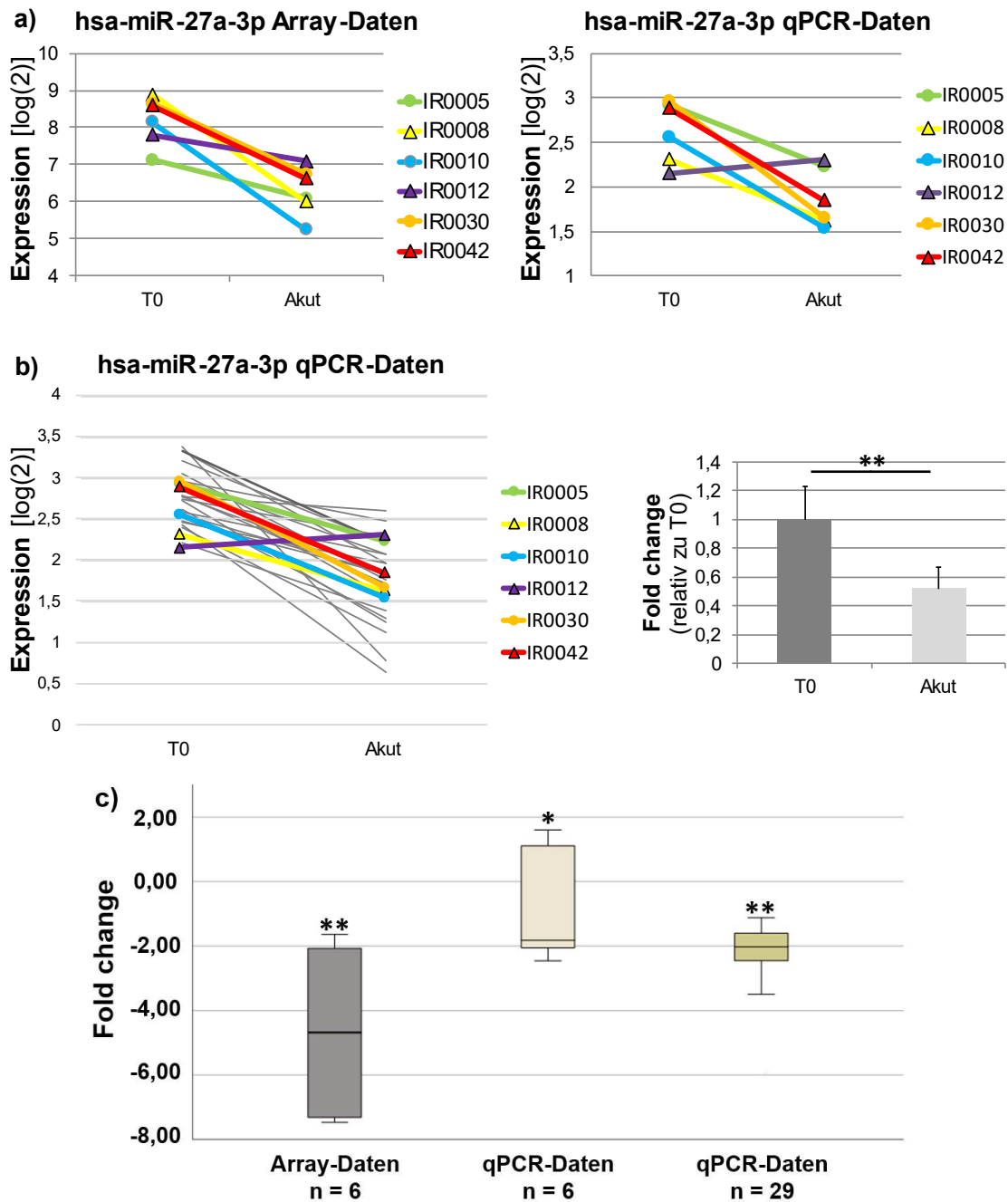
**Abbildung 25 Veränderung von miR-133a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farbig hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*\*) markiert eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



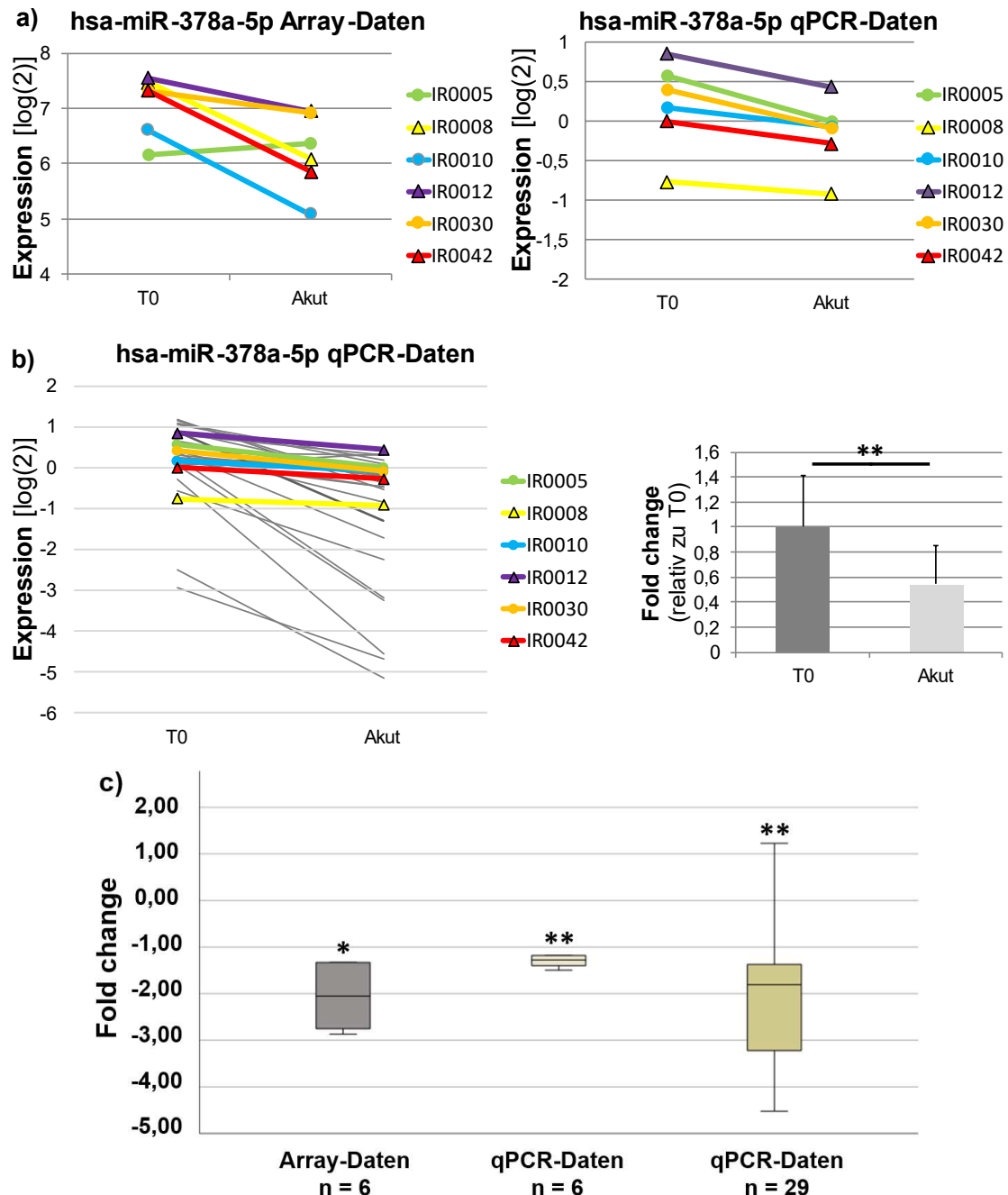
**Abbildung 26 Veränderung von miR-133b bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farbig hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



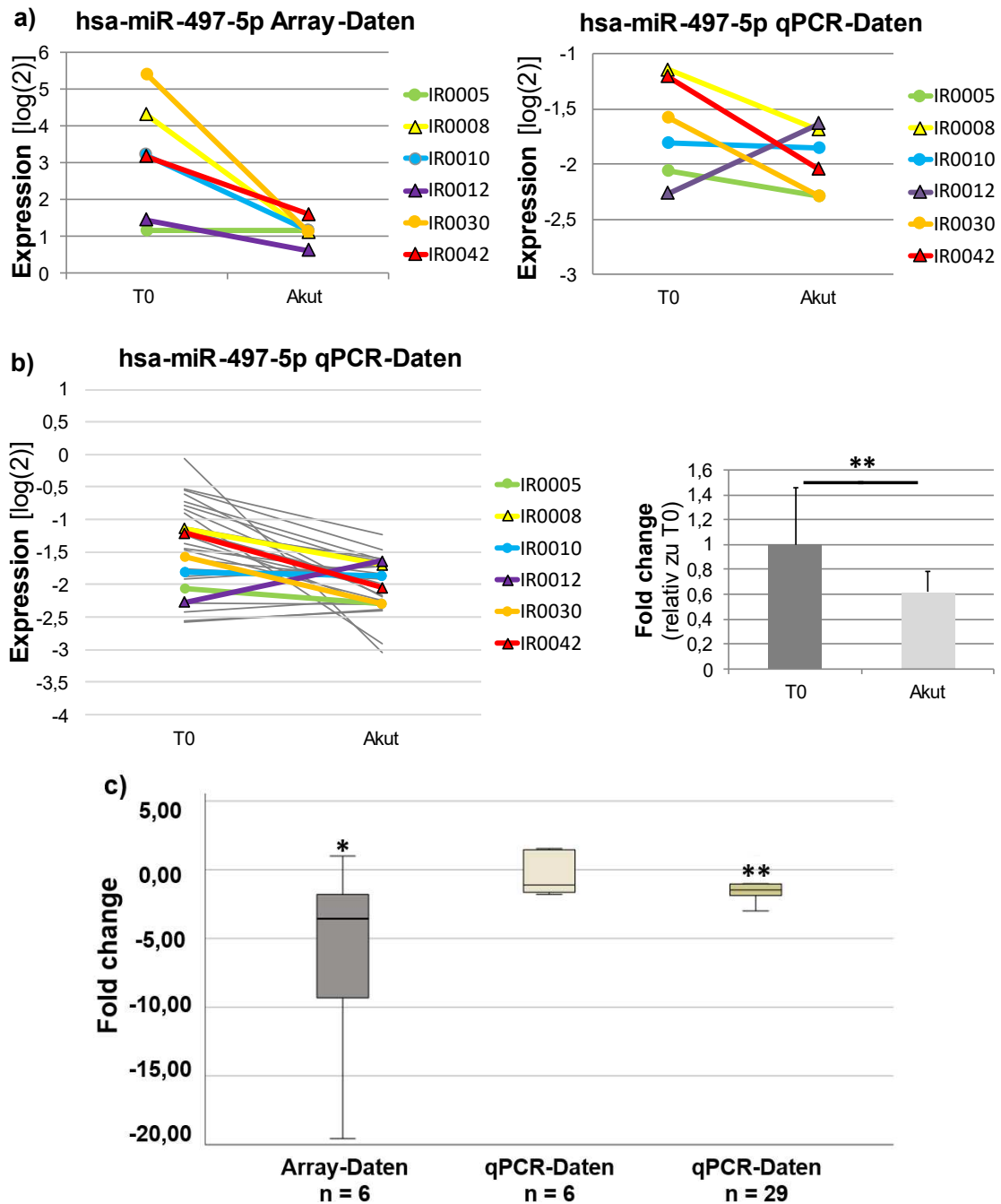
**Abbildung 27 Veränderung von miR-499a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



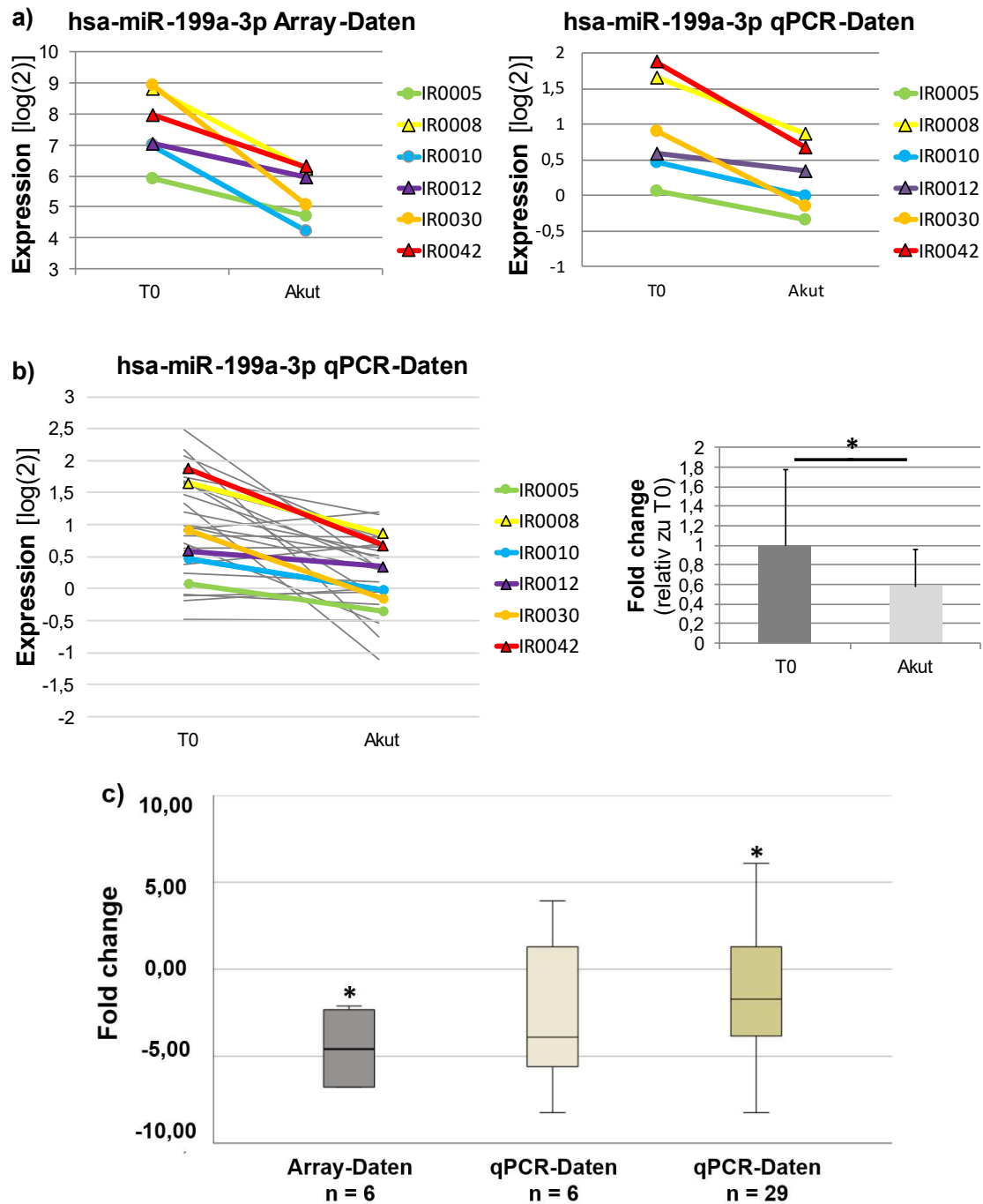
**Abbildung 28: Veränderung von miR-27a-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa.: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



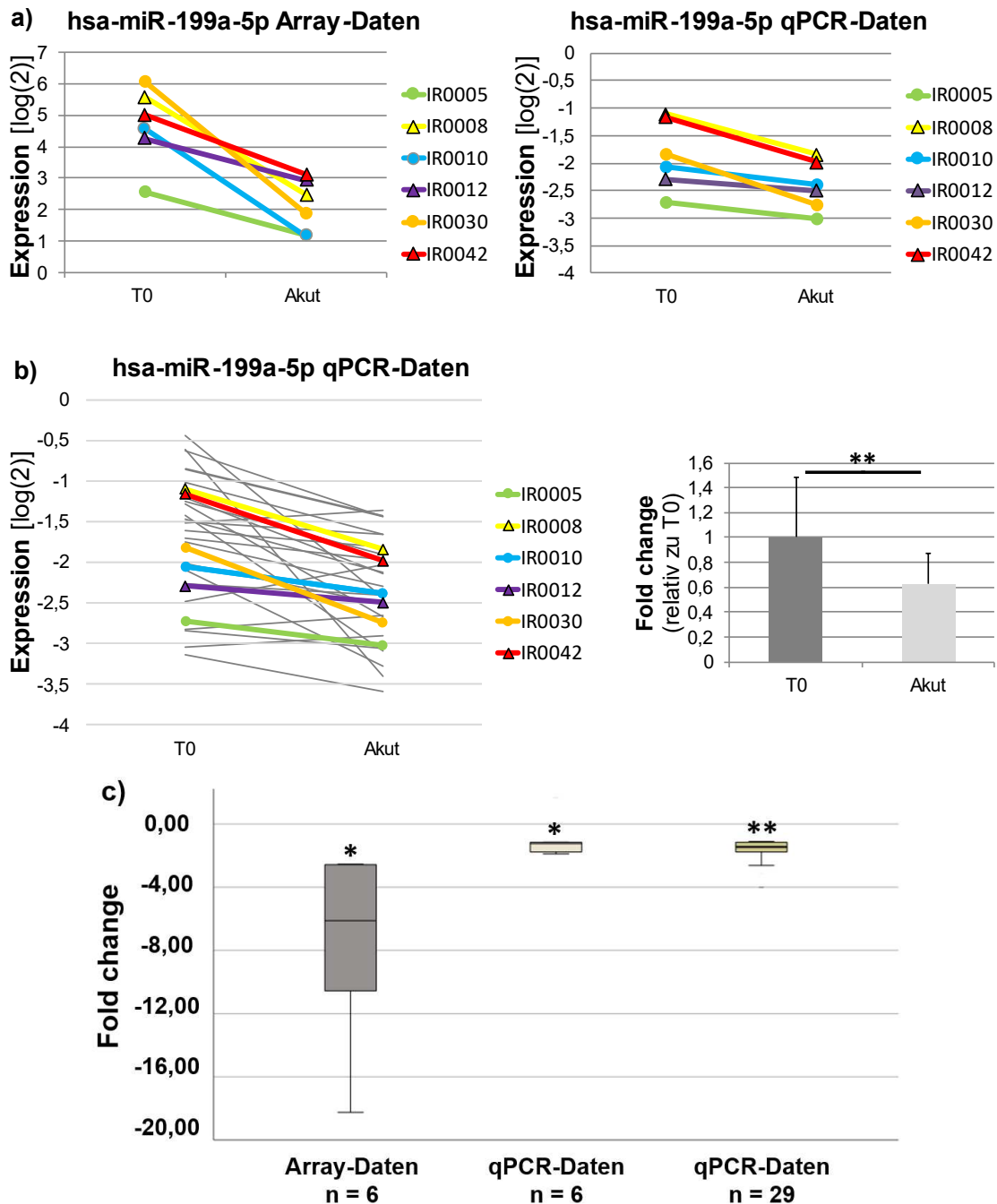
**Abbildung 29: Veränderung von miR-378a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten ( $n = 6$ ) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv ( $n = 29$ ). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



**Abbildung 30: Veränderung von miR-497-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

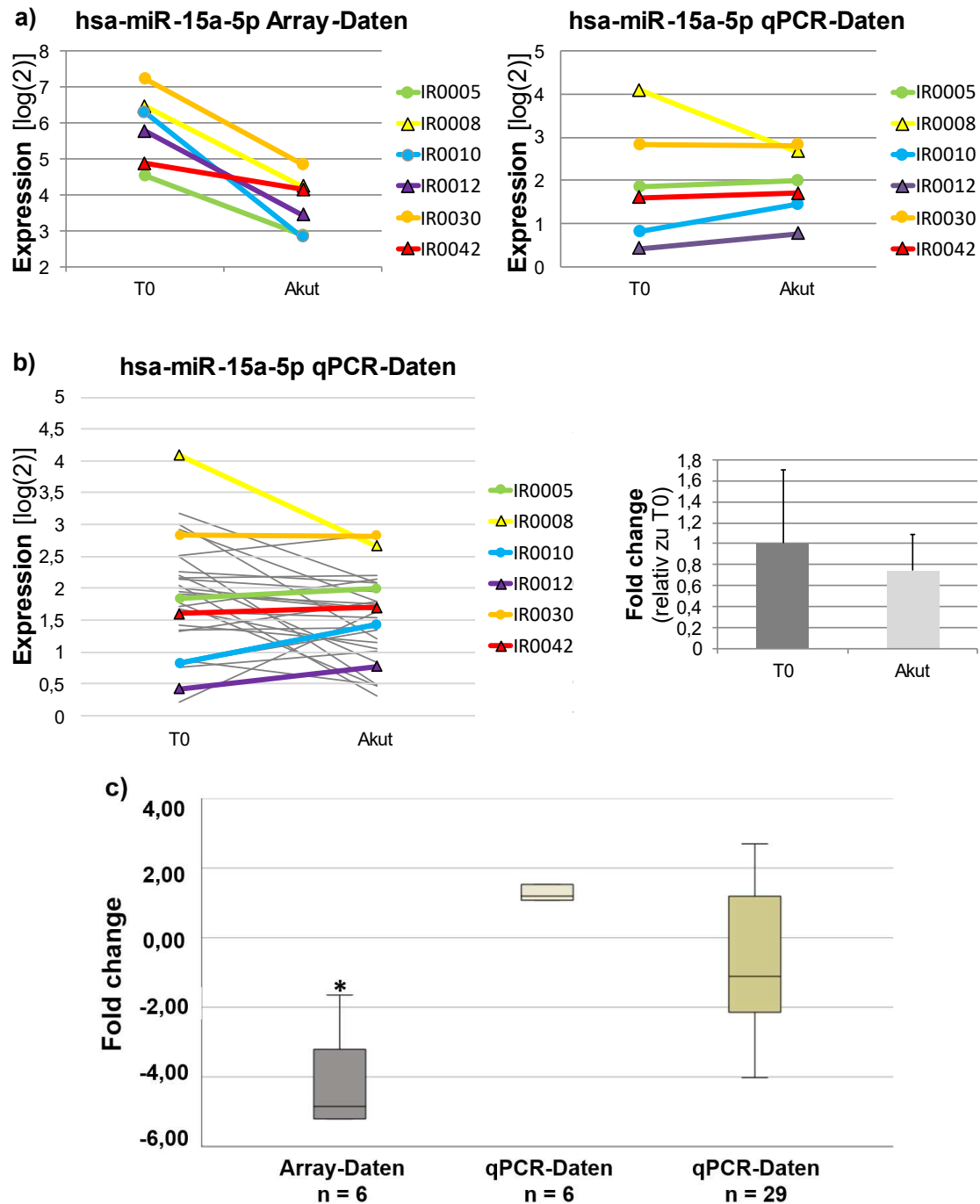


**Abbildung 31 Veränderung von miR-199a-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapite 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

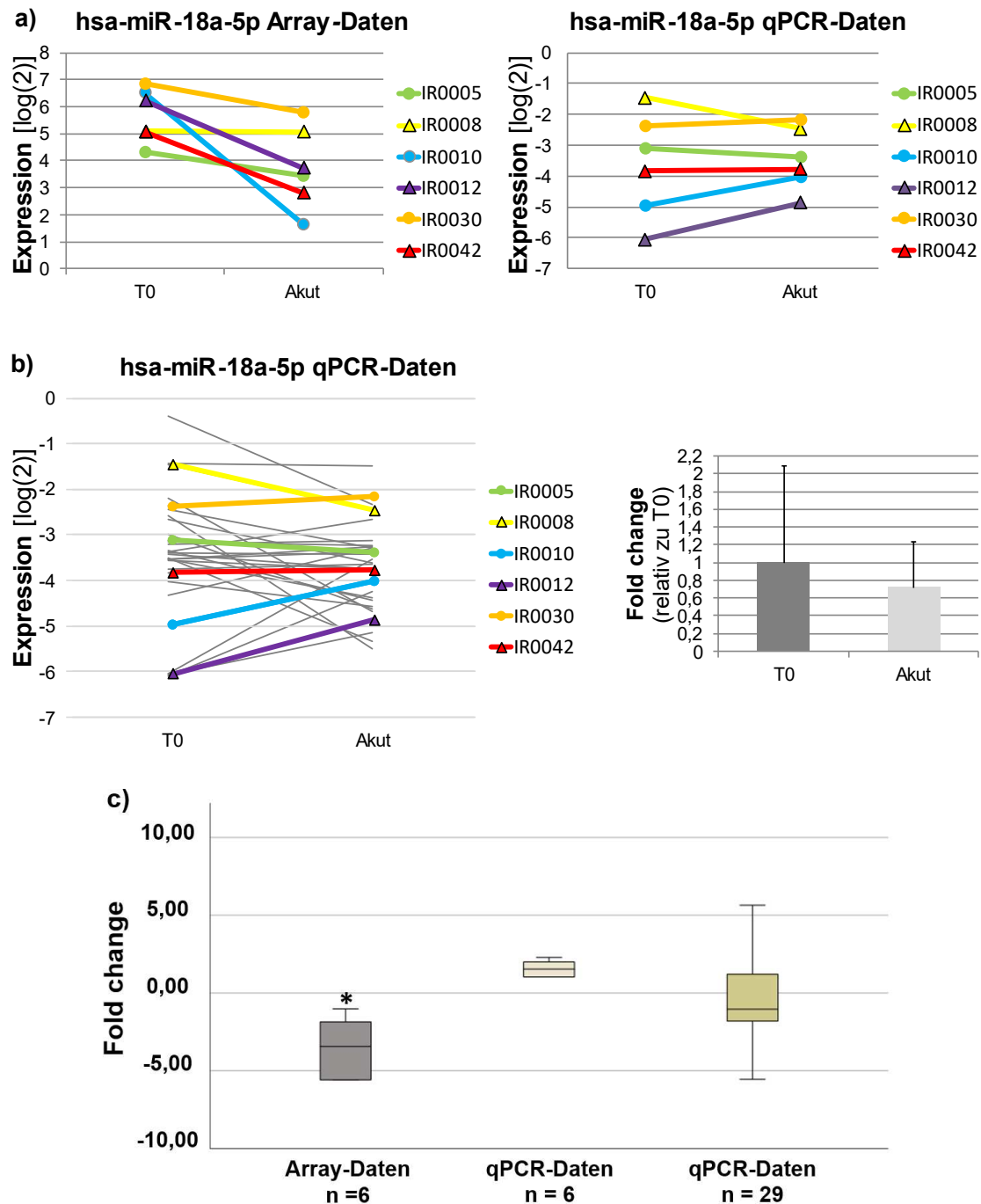


**Abbildung 32: Veränderung von miR-199a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa.: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

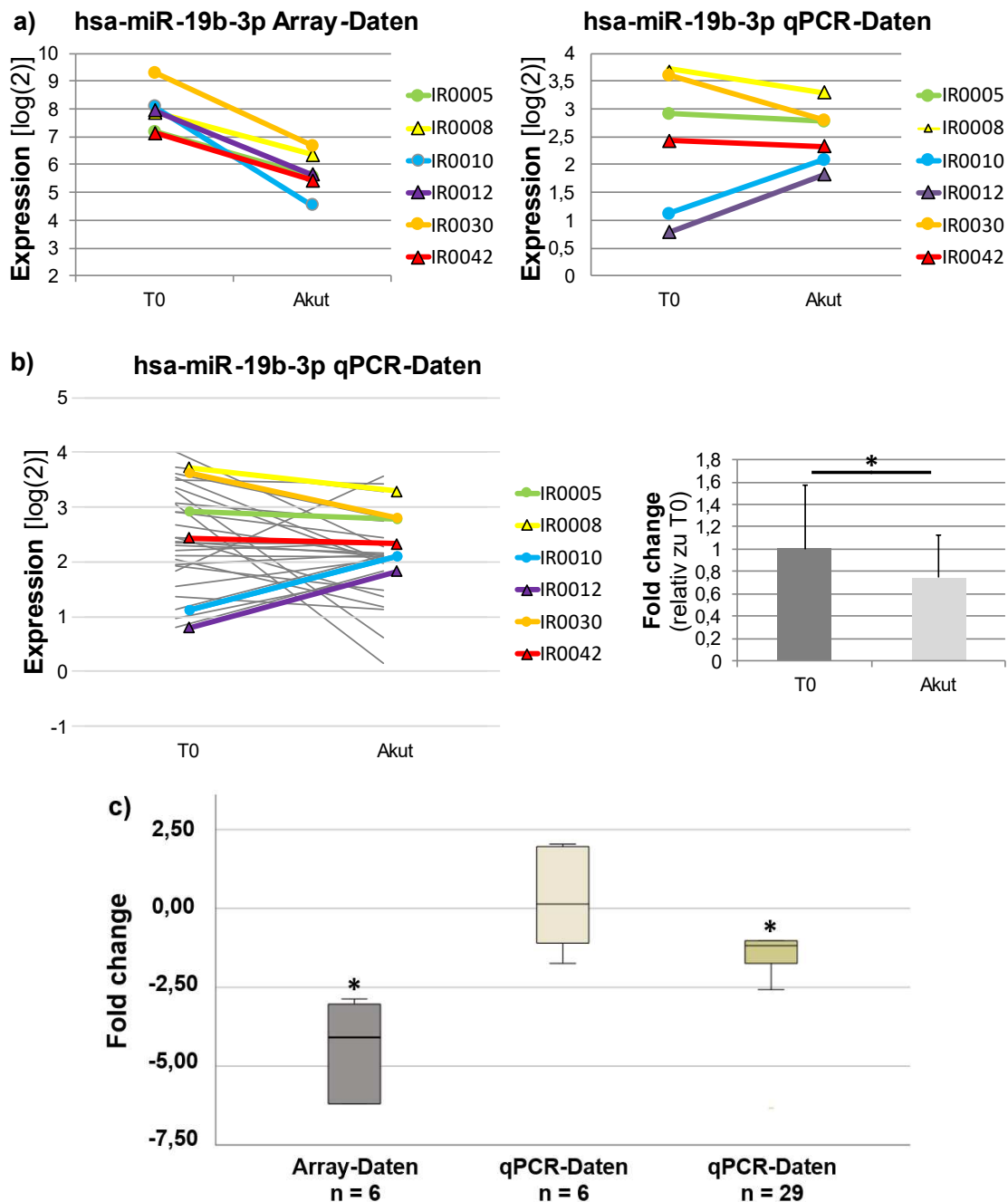




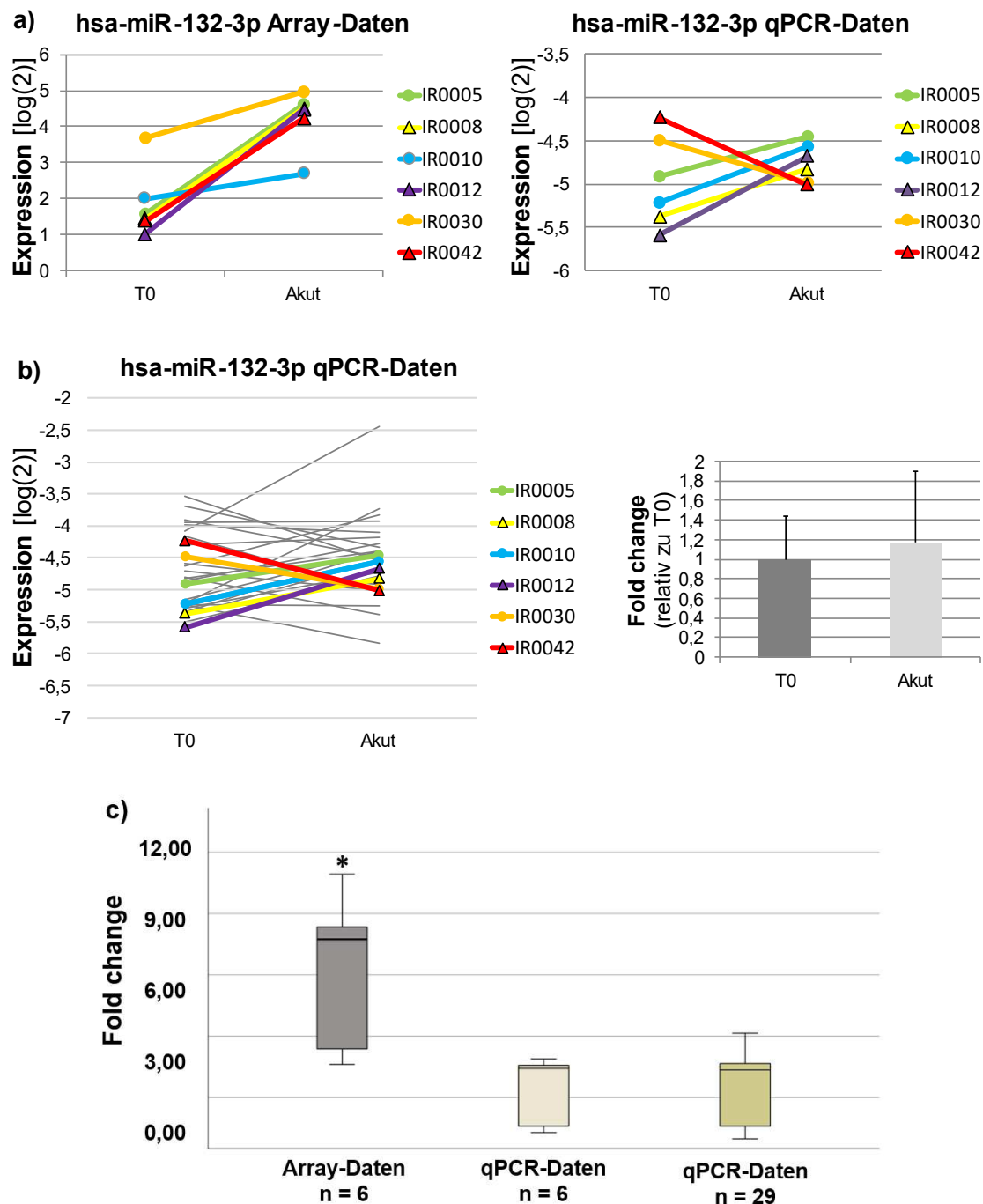
**Abbildung 33: Veränderung von miR-15a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farbig hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



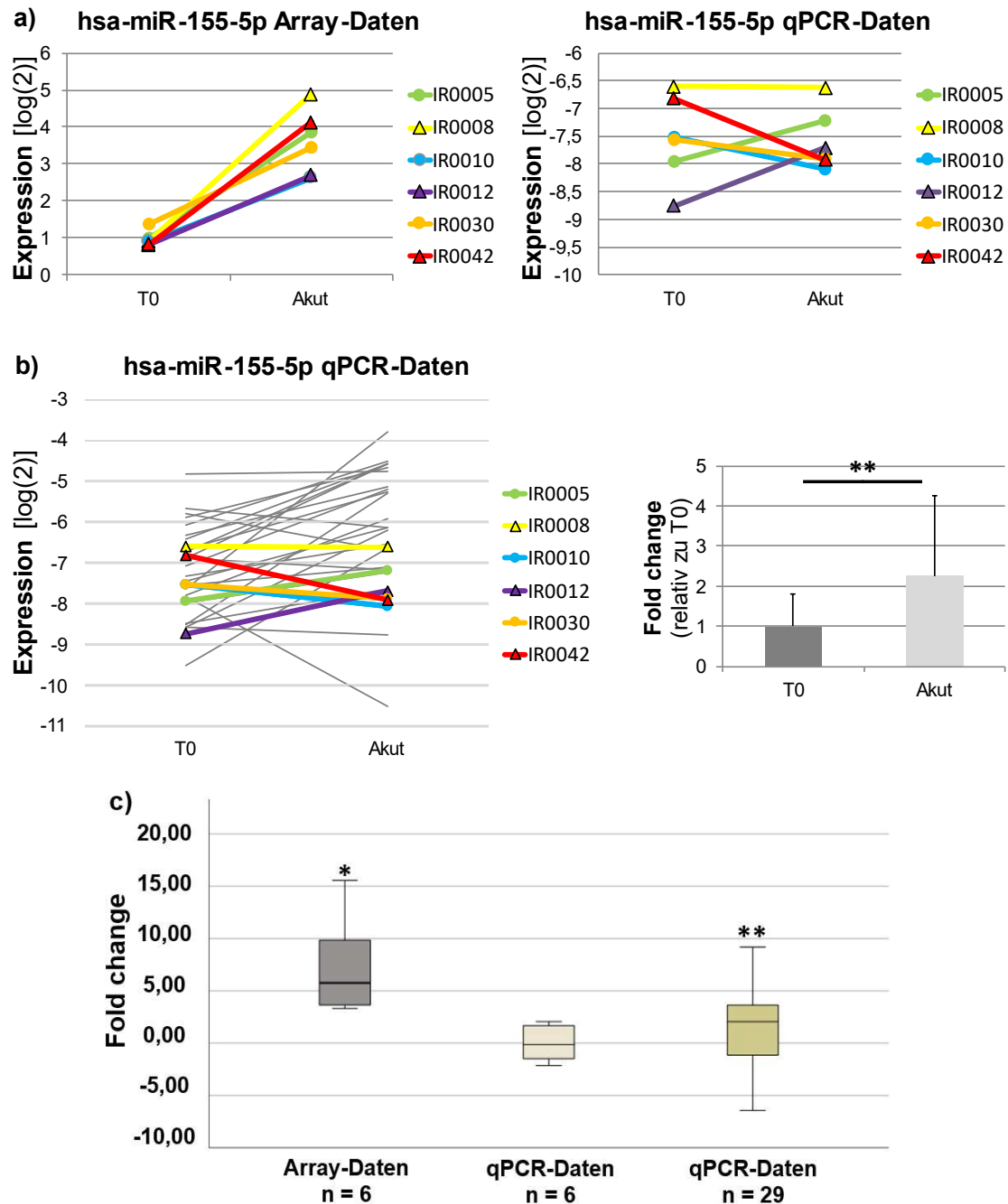
**Abbildung 34: Veränderung von miR-18a-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



**Abbildung 35: Veränderung von miR-19b-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

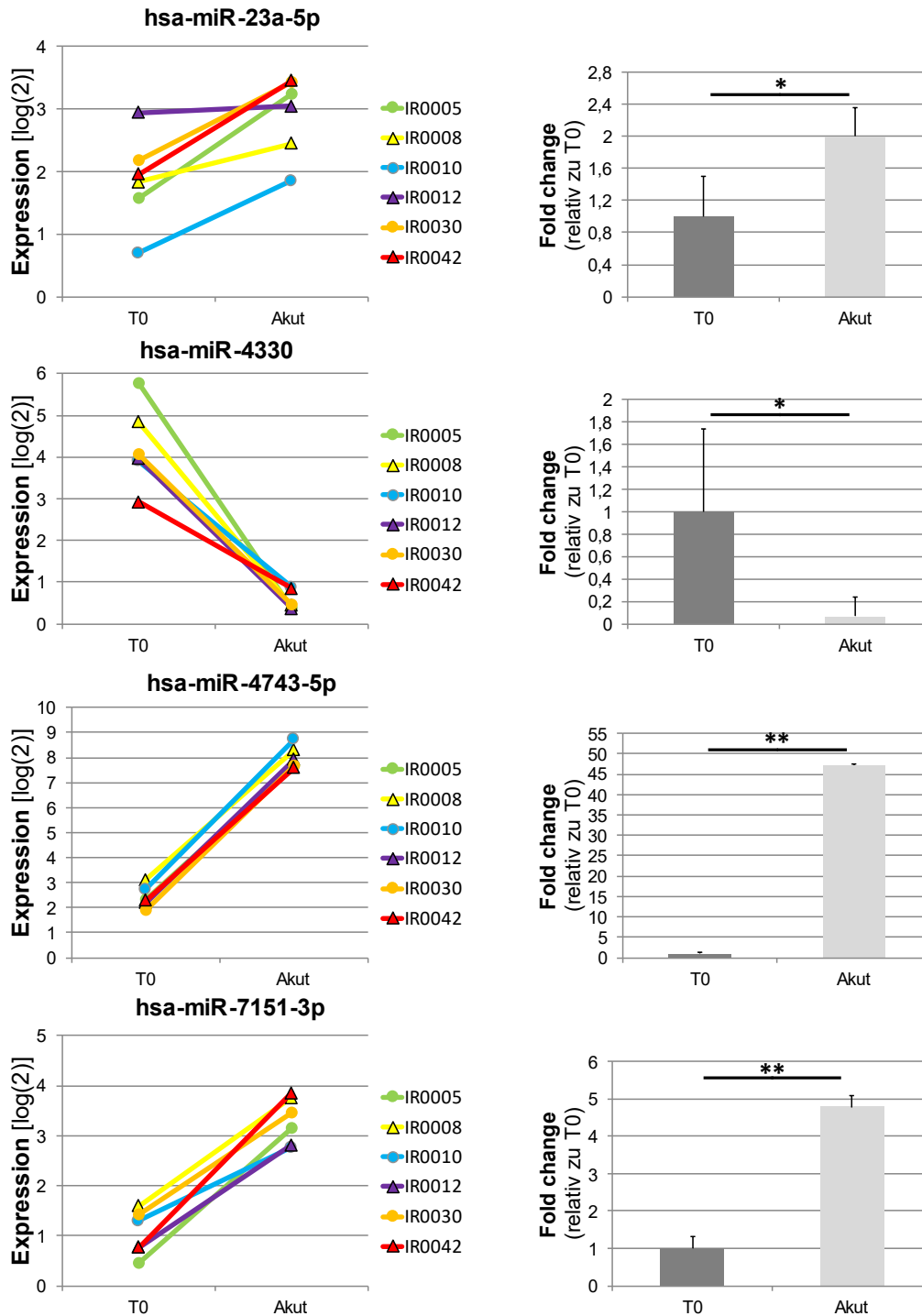


**Abbildung 36: Veränderung von miR-132-3p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensiv kontinuerliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

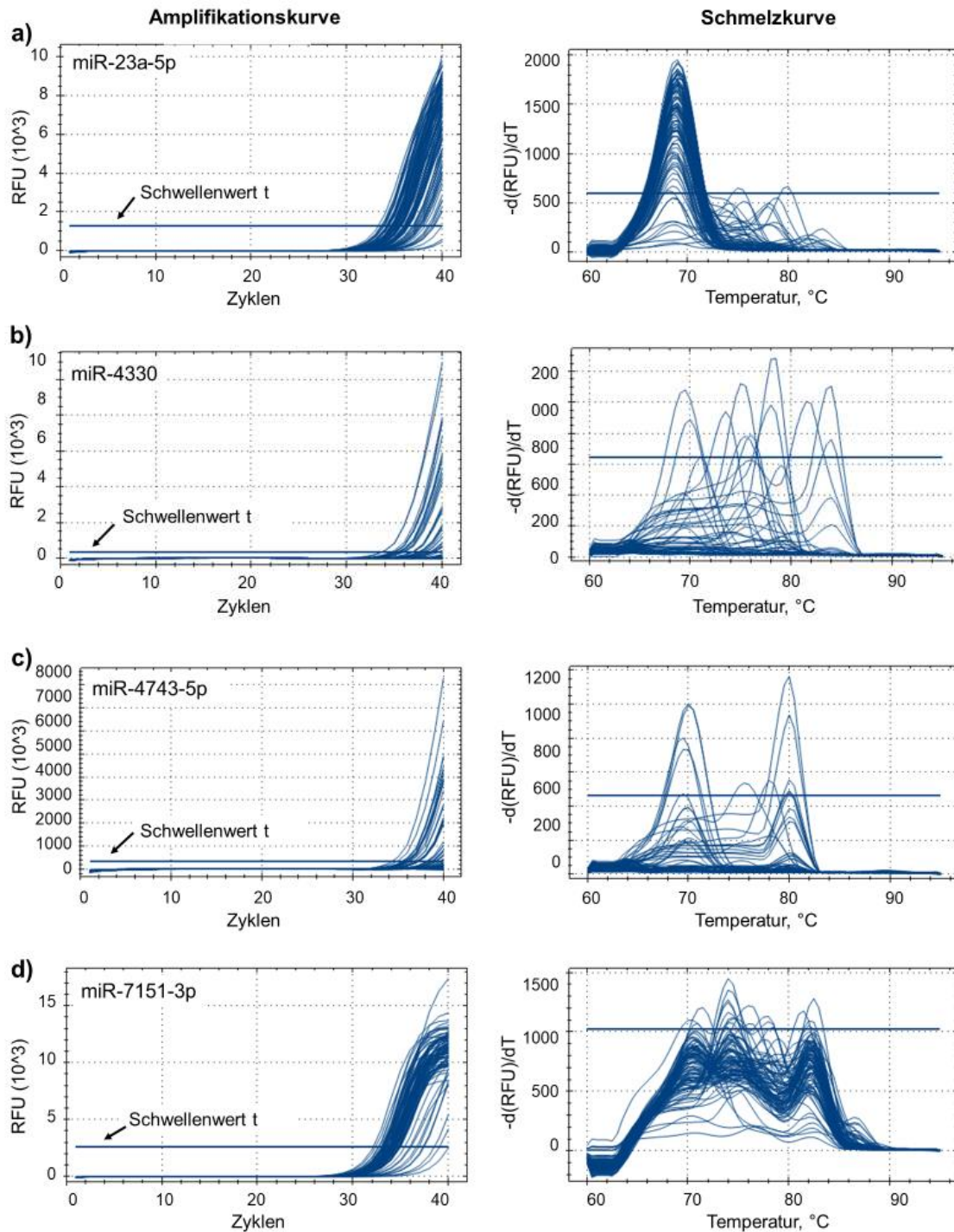


**Abbildung 37: Veränderung von miR-155-5p bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur.** a) Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Daten (n = 6) und b) Veränderung der Expression in der qPCR-Analyse im Gesamtkollektiv (n = 29). Farblich hervorgehoben sind die Expressionswerte der miRNA-Profile, die initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Kreise markieren Probandinnen, die zuerst das moderat-intensive kontinuierliche Training durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). c) Vergleich der errechneten *Fold change* im Mikroarray und in der qPCR. Log(2): *Logarithmus dualis*; hsa-: *Homo sapiens*; IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer; T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.

In die qPCR-Experimente sollte zudem die Analyse von miR-23a-5p, miR-4330, miR-4743-5p sowie miR-7151-3p miteingeschlossen werden. Diese hatten in der Mikroarray-Analyse eine (hoch)signifikante Veränderung ihrer Expression aufgewiesen (s. Abbildung 38). Zudem korrelierten die belastungsinduzierten Veränderungen der miRNA-Profile von miR-4330 ( $\Delta$ miR-4330), miR-4743-5p ( $\Delta$ miR-4743-5p) sowie miR-7151-3p ( $\Delta$ miR-7151-3p) mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$  (s. Tabelle 11). In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich jedoch, wie bereits in Kapitel 3.2.4 kurz beschrieben, eine Anhäufung unspezifischer PCR-Produkte. Zudem erreichte das Fluoreszenzsignal der Proben den Schwellenwert t erst nach dem 30. PCR-Zyklus und bei der Mehrzahl der Dupletts errechnete sich eine Ct-Wert-Differenz  $> 1$  (s. Abbildung 39). Daher wurden diese vier miRNAs aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.



**Abbildung 38: Mikroarray-Daten für miR-23a-5p, miR-4330, miR-4743-5p und miR-7151-3p.** Rechts: Veränderung der miRNA-Expression zwischen den Zeitpunkten T0 und T<sub>Akut</sub> im *Logarithmus dualis* (Log(2)). Links: Veränderung der miRNA-Expression zum Zeitpunkt T<sub>Akut</sub> relativ zu T0. Kreise markieren Probandinnen, die im ersten Trainingsblock das moderat-intensive kontinuierliche Training (MICT) durchführten, Dreiecke markieren Probandinnen, die zunächst das hochintensive Intervalltraining (HIIT) absolvierten (s. Kapitel 2.4.3). T0: Zeitpunkt vor Trainingsbeginn; Akut: Zeitpunkt nach Beendigung der akuten aeroben Belastung (s. Kapitel 2.4.3); das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) eine hochsignifikante Veränderung zwischen den beiden Zeitpunkten.



**Abbildung 39: Amplifikations- und Schmelzkurvenanalyse von miR-23a-5p, miR-4330, miR-4743-5p und miR-7151-3p.** Links: Amplifikationskurve, rechts: Schmelzkurve von: a) miR-23a-5p, b) miR-4330, c) miR-4743-5p, d) miR-7151-3p. Das Fluoreszenzsignal der PCR-Produkte überschreitet den Schwellenwert  $t$  erst nach dem 30. PCR-Zyklus und es fällt eine breite Streuung der Ct-Werte zwischen den Proben auf. Die Schmelzkurven weisen mehrere Schmelzpunkte auf. Dies deutet auf die Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte, bspw. *Primer-Dimere*, hin. Die Schmelz- und Amplifikationskurven wurden mit dem Programm CFX Manager Version 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) erstellt. Ct: *Cycle Threshold*; RFU: relative Fluoreszenzintensität.



### 3.3 Korrelationsanalysen

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist es, die Veränderung des miRNA-Profiles als prognostischen Parameter der trainingsinduzierten Verbesserung der kardiorespiratorischen Fitness zu evaluieren. Die  $\dot{V}O_{2\max}$  [ml/kg×min] spiegelt die aerobe Ausdauerleistung wider (Wenger & Bell, 1986) und wurde daher in dieser Arbeit als primärer Marker des Fitnessniveaus betrachtet. Als sekundärer Parameter wurde die  $\Delta LTP_2$  [W], also die Veränderung der Leistung, die an der  $LT_2$  erbracht wurde, in die Analyse eingeschlossen, da diese Schwelle als Marker der „metabolischen Ausdauerleistungsgrenze“ betrachtet wird (Berg, 1993).

Die Veränderung der miRNA-Muster bei der belastungsinduzierten Akutantwort der Skelettmuskulatur wurde dabei mit der Veränderung der physiologischen Parameter zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des ersten Trainingsblocks ( $\Delta T_0/T_1$ ) bzw. Beendigung des zweiten Trainingsregimes ( $\Delta T_0/T_2$ ) sowie mit der Veränderung der  $\dot{V}O_{2\max}$  und  $LTP_2$  zwischen den beiden Trainingsblöcken ( $\Delta T_1/T_2$ ) korreliert (s. Kapitel 2.4.3, Abbildung 7 und 8).

Die Probandinnen starteten entweder mit einem sechswöchigen hochintensiven (HIIT-MICT-Gruppe) oder mit einem sechswöchigen moderat-intensiven Training (MICT-HIIT-Gruppe). Die getrennte Analyse beider Gruppen ermöglichte somit die Untersuchung der Einflüsse der unterschiedlichen Trainingsprogramme auf die Beziehung zwischen der Veränderung der miRNA-Expression und den Veränderungen der physiologischen Parameter. In der zweiten Trainingsperiode absolvierten die Teilnehmerinnen das jeweils andere Trainingsregime. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob eine fehlende oder wenig ausgeprägte Reaktion auf den ersten Trainingsmodus eine tatsächliche Nicht-Antwort auf Training allgemein widerspiegelte oder ob durch die Wahl einer alternativen Trainingsmodalität doch eine Trainingsantwort erzielt werden kann.

Der Grenzwert des Korrelationskoeffizienten in Abhängigkeit von n wurde mit der *Software* G\*Power v. 3.1.9.7 (Faul et al., 2007) berechnet (s. Tabelle 10), wobei die Zahl der pro Analyse eingeschlossenen Teilnehmerinnen zwischen elf und 16 variierte, weshalb der Schwellenwert bei  $|r| = \geq 0,5$  für die nachfolgenden Analysen gesetzt wurde.

### **3.3.1 Auswertung der $\dot{V}O_2\text{max}$ -Daten**

Insgesamt nahmen 29 Probandinnen mindestens bis zur Beendigung des ersten Trainingsblocks (T1-Zeitpunkt) an dem Studienprogramm teil. Dreizehn der Teilnehmerinnen starteten mit dem sechswöchigen HIIT, 16 Teilnehmerinnen absolvierten zunächst das sechswöchige MICT. Auf Grund der Covid-19-Pandemie, die im März 2020 dazu führte, dass die letzte Trainingsgruppe keinen zweiten Trainingsblock durchführen konnte, konnten nur 23 Probandinnen den zweiten sechswöchigen Trainingsblock beenden. Dementsprechend absolvierten elf Testpersonen im zweiten Trainingsabschnitt das MICT, zwölf Teilnehmerinnen führten das HIIT als zweite Trainingsmodalität aus (s. Kapitel 2.4, Abbildung 7 und 8).

Die  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Werte vor Beginn des Trainingsprogramms betrugen durchschnittlich  $29,98 \pm 3,22$  ml/kg $\times$ min und zwischen den beiden Trainingsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied der  $\dot{V}O_2\text{max}$ -T0-Werte festgestellt werden ( $p = 0,207$ ) (s. Tabelle 18). Sowohl das initiale sechswöchige HIIT als auch das initiale sechswöchige MICT führten zu einer signifikanten Steigerung der  $\dot{V}O_2\text{max}$ , wobei die Zunahme in der HIIT-Trainingsgruppe signifikant stärker ausfiel (MW:  $5,23 \pm 1,69$  ml/kg $\times$ min vs.  $2,63 \pm 2,36$  ml/kg $\times$ min;  $p = 0,003^{**}$ ). Nach Umstellung der Trainingsmodalität von HIIT auf MICT zeigte sich in dieser Trainingsgruppe eine (nichtsignifikante) Reduktion der  $\dot{V}O_2\text{max}$  (MW:  $-0,51 \pm 2,9$  ml/kg $\times$ min), wohingegen das HIIT im Anschluss an das MICT zu einer weiteren signifikanten Zunahme der  $\dot{V}O_2\text{max}$  führte (MW:  $2,22 \pm 1,88$  ml/kg $\times$ min;  $p = 0,012^*$ ), woraus eine signifikante Differenz der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  T1/T2 zwischen den beiden Trainingsgruppen resultierte ( $p = 0,018^*$ ). Die Zunahme der  $\dot{V}O_2\text{max}$  über die gesamte Trainingsperiode hinweg zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in den  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ -T2-Werten der beiden Trainingsgruppen ( $p = 0,935$ ) (s. Tabelle 18).

Trainings- block 1	$\dot{V}O_2\text{max.}$ T0 [ml/kg× min]	$\dot{V}O_2\text{max.}$ T1 [ml/kg× min]	$\Delta\dot{V}O_2\text{max.}$ T0/T1 [ml/kg× min]	Trainings- block 2	$\dot{V}O_2\text{max.}$ T2 [ml/kg× min]	$\Delta\dot{V}O_2\text{max.}$ T0/T2 [ml/kg× min]	$\Delta\dot{V}O_2\text{max.}$ T1/T2 [ml/kg× min]
<b>ges. Kohorte</b> (n = 29)	29,98 ± 3,22	33,92 ± 4,02	3,8 ± 2,45	<b>ges. Kohorte</b> (n = 23)	34,89 ± 4,1	4,98 ± 3,08	0,91 ± 2,78
<b>HIIT-MICT</b> (n = 13)	30,84 ± 2,74	36,07 ± 2,61	5,23 ± 1,69	<b>HIIT-MICT</b> (n = 11)	36,2 ± 3,55	4,81 ± 3,04	-0,51 ± 2,9
<b>MICT-HIIT</b> (n = 16)	29,28 ± 3,4	31,91 ± 3,7	2,63 ± 2,36	<b>MICT-HIIT</b> (n = 12)	33,69 ± 3,81	4,92 ± 3,11	2,22 ± 1,88

**Tabelle 18:  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Daten der Probandinnen der qPCR-Analyse.** Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen ( $\pm$ ) der gesamten Kohorte sowie der beiden Trainingsgruppen. Den ersten Trainingsblock beendeten 29 Probandinnen. Dies entspricht der Kohorte „Trainingsblock 1“. Auf Grund der Covid-19-Pandemie vollendeten nur 23 Probandinnen den zweiten Trainingsblock. Dies entspricht der Kohorte „Trainingsblock 2“. Dementsprechend verkleinerte sich auch die Teilnehmerinnenzahl der einzelnen Trainingsgruppen. HIIT-MICT: Trainingsgruppe, die zunächst das sechswöchige HIIT und im Anschluss das sechswöchige MICT absolvierten; MICT-HIIT: Trainingsgruppe, die zunächst das sechswöchige MICT und anschließend das sechswöchige HIIT absolvierten; MICT: moderat-intensives kontinuierliches Training; HIIT: hochintensives Intervalltraining;  $\dot{V}O_2\text{max}$ : maximale Sauerstoffaufnahme;  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ : Veränderung der maximalen Sauerstoffaufnahme zwischen Trainingsbeginn (T0) und Beendigung des ersten sechswöchigen Trainingsblocks (T1) ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$ ) bzw. zwischen Trainingsbeginn (T0) und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks (T2) ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T2}$ ) bzw. zwischen Beendigung des ersten und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T1/T2}$ ); ges. Kohorte: gesamte Kohorte.

### **3.3.2 Korrelation zwischen der trainingsinduzierten $\Delta\dot{V}O_{2max}$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der qPCR-Analyse**

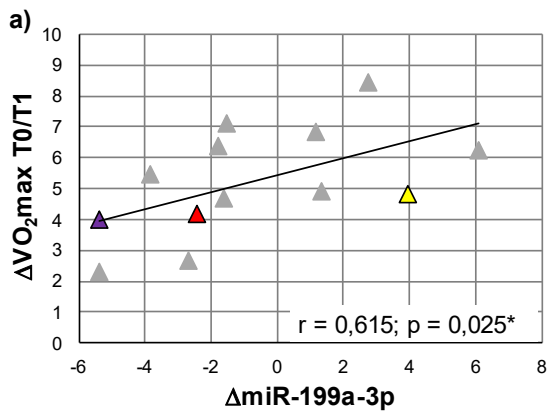
Nach Beendigung des ersten Trainingsblocks zeigte sich wie oben dargestellt in beiden Trainingsgruppen eine hochsignifikante Zunahme der  $\dot{V}O_{2max}$  (HIIT:  $p = 0,000^{**}$ ; MICT:  $p = 0,001^{**}$ ) (s. Tabelle 18). Hierbei korrelierte die  $\Delta\dot{V}O_{2max}$  nach Abschluss des sechswöchigen HIITs der ersten Trainingsperiode signifikant mit der  $\Delta miR-199a-3p$  ( $r = 0,6$ ;  $p = 0,025^*$ ) (s. Abbildung 40a). In der Trainingsgruppe, die zunächst das sechswöchige MICT durchführte, fiel hingegen eine starke signifikante Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_{2max} T0/T1$  und der  $\Delta miR-19b-3p$  ( $r = 0,5$ ;  $p = 0,04^*$ ) auf (s. Abbildung 40a).

Die Ausübung des HIITs als zweite Trainingsmodalität führte ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der  $\dot{V}O_{2max}$  ( $\Delta\dot{V}O_{2max} T1/T2$ ;  $p = 0,012^*$ ) (s. Tabelle 18). Diese korrelierte positiv mit der  $\Delta miR-499a-5p$  ( $r = 0,542$ ;  $p = 0,08$ ) (s. Abbildung 40b). In der Trainingsgruppe, die das MICT in der zweiten Periode durchführte, konnte hingegen keine signifikante Veränderung der  $\dot{V}O_{2max} T1/T2$  ( $p = 0,588$ ) detektiert werden (s. Tabelle 18).

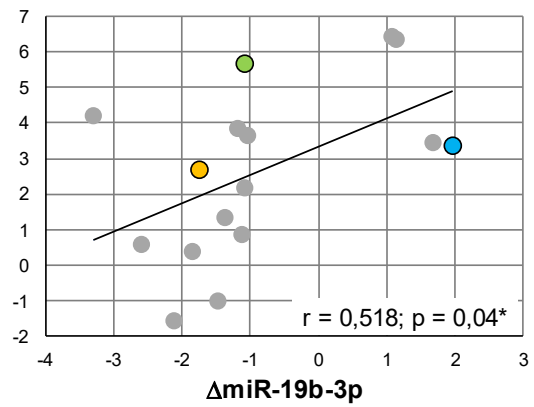
Die beiden Trainingsgruppen absolvierten jeweils ein sechswöchiges HIIT sowie ein sechswöchiges MICT, jedoch unterschied sich, wie bereits beschrieben, die zeitliche Abfolge der beiden Trainingsmodalitäten. In beiden Kohorten zeigte sich nach Abschluss des zwölfwöchigen Trainingsprogramms eine signifikante Zunahme der  $\dot{V}O_{2max}$  ( $p = 0,001^{**}$ ) (s. Tabelle 18). Daher war es von Interesse, die Korrelation zwischen der belastungsinduzierten akuten Veränderung des miRNA-Profiles und der  $\Delta\dot{V}O_{2max}$  nach Abschluss des gesamten Trainingsprogramms ( $\Delta\dot{V}O_{2max} T0/T2$ ) zu analysieren. Hierbei zeigten sich trotz der vergleichbaren Fitnesssteigerung erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Trainingsgruppen.

Nach Abschluss des gesamten zwölfwöchigen Trainingsprogramms zeigte sich in der HIIT-MICT-Kohorte eine starke negative Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_{2max} T0/T2$  und der  $\Delta miR-133a-3p$  ( $r = -0,5$ ;  $p = 0,117$ ), der  $\Delta miR-133a-5p$  ( $r = -0,509$ ;  $p = 0,110$ ) sowie der  $\Delta miR-27a-3p$  ( $r = -0,555$ ;  $p = 0,077$ )

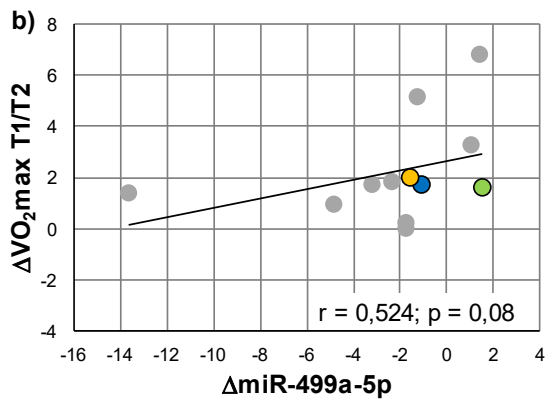
(s. Abbildung 40c). Im Gegensatz hierzu konnte in der MICT-HIIT-Gruppe eine starke Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_{2\max} T0/T2$  mit der  $\Delta miR-199a-5p$  ( $r = 0,524$ ;  $p = 0,08$ ) sowie mit der  $\Delta miR-497-5p$  ( $r = 0,503$ ;  $p = 0,095$ ) detektiert werden (s. Abbildung 40c). Es konnte keine Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_{2\max} T0/T2$  und der Veränderung der miRNA-Expression bei der Betrachtung der gesamten Kohorte ( $n = 23$ ) beobachtet werden. Eine Übersicht über die Korrelationen zwischen der  $\Delta\dot{V}O_{2\max}$  der verschiedenen Zeitfenster und der Veränderung der miRNA-Expression bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur ist in Tabelle 20 aufgelistet.



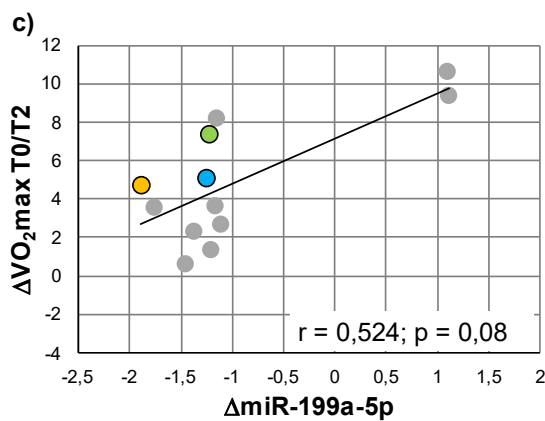
▲ HIIT-MICT-Trainingsgruppe;  
▲ IR0008, ▲ IR0012, ▲ IR00042



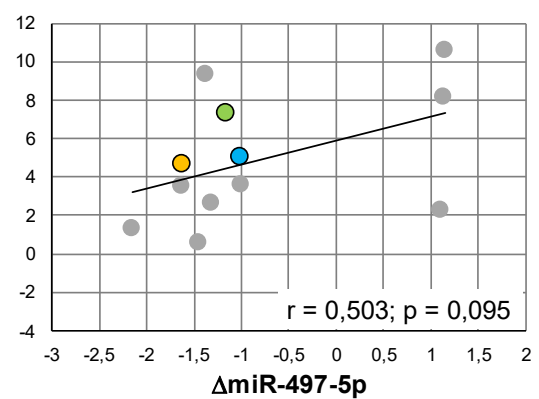
● MICT-HIIT-Trainingsgruppe;  
● IR0005, ● IR0010, ● IR0030

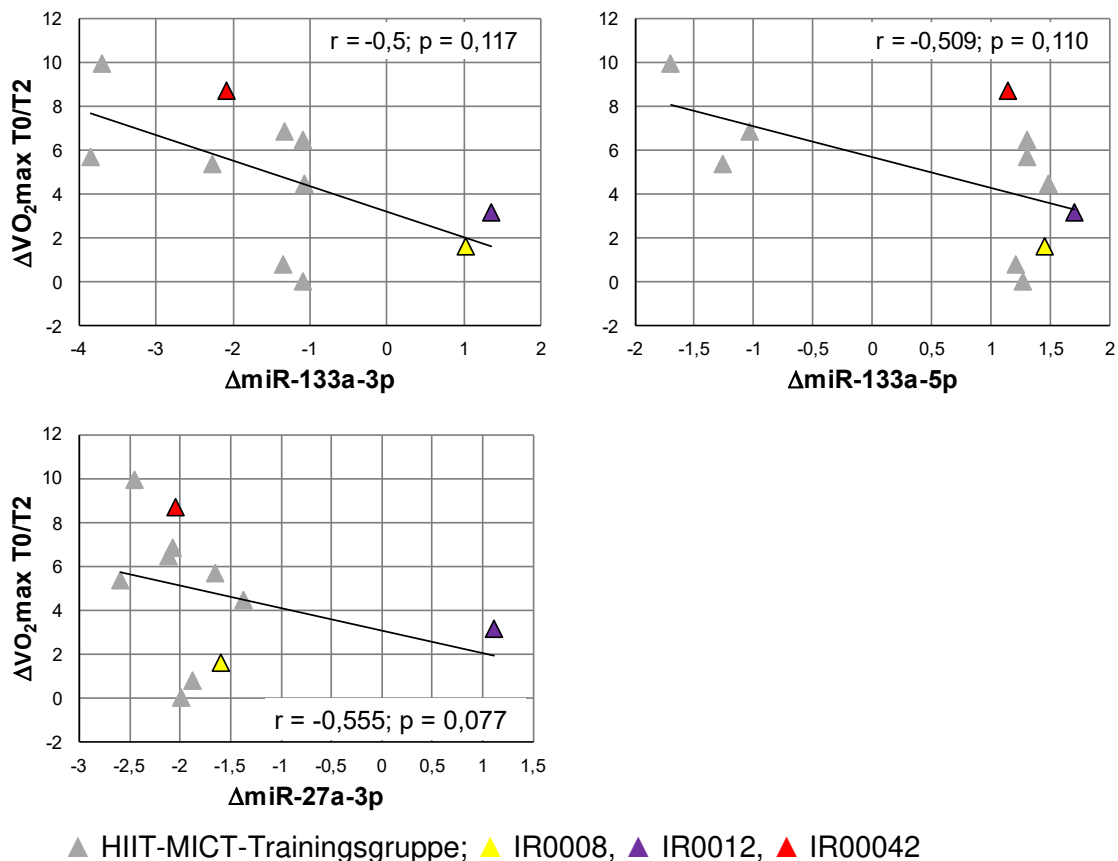


● MICT-HIIT-Trainingsgruppe;  
● IR0005, ● IR0010, ● IR0030



● MICT-HIIT-Trainingsgruppe; ● IR0005, ● IR0010, ● IR0030





**Abbildung 40: Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  und den belastungsinduzierten miRNA-Aktutmustern der Skelettmuskulatur.** Dargestellt sind die Regressionsgeraden der miRNAs, die eine starke Korrelation ( $r = \geq 0,5$  bzw.  $\leq -0,5$ ) mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$  (a), mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T1/T2}$  (b) bzw. mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T2}$  (c) aufwiesen. Farblich hervorgehoben sind die Werte der sechs Probandinnen, deren miRNA-Profil initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Der Spearmansche Korrelationskoeffizient  $r$  sowie die jeweiligen  $p$ -Werte können den Graphen entnommen werden. Signifikante Beziehungen sind mit (\*) markiert.  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ : Veränderung der maximalen Sauerstoffaufnahme [ $\text{ml/kg}\times\text{min}$ ] zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des ersten sechswöchigen Trainingsblocks ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T1}$ ) bzw. zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T0/T2}$ ) bzw. zwischen Beendigung des ersten und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max T1/T2}$ );  $\Delta\text{miR-}$ : Veränderung der miRNA-Expression in der Skelettmuskulatur in Reaktion auf eine einzelne aerobe Belastung;  $r$ : Spearmansche Korrelationskoeffizient; MICT: moderat-intensives kontinuierliches Training; HIIT: hochintensives Intervalltraining. IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer.

### **3.3.3 Auswertung der LTP<sub>2</sub>-Daten**

Vor Beginn des Trainingsprogramms zeigte sich zwischen den beiden Trainingsgruppen keine signifikante Differenz in der erbrachten Leistung an der LT<sub>2</sub> ( $p = 0,269$ ). Daher kann von einer vergleichbaren Fitness zwischen den Teilnehmerinnen ausgegangen werden. Durch das initiale HIIT nahm die LTP<sub>2</sub> mit einer durchschnittlichen Steigerung von  $27,93 \pm 11,63$  W signifikant stärker zu im Vergleich zu der Steigerung in Reaktion auf ein initiales MICT (MW:  $7,34 \pm 13,53$  W) ( $p = 0,00008^{**}$ ) (s. Tabelle 19).

Übereinstimmend mit der  $\Delta\dot{V}O_{2\max}$  T1/T2 führte ein sechswöchiges HIIT im Anschluss an ein initiales sechswöchiges MICT zu einer signifikant höheren Steigerung der Leistung, die an der LT<sub>2</sub> erbracht wurde (MW:  $16,18 \pm 10,42$  W), verglichen mit der Veränderung in Reaktion auf die Durchführung des MICTs als zweite Trainingsmodalität (MW:  $-0,14 \pm 14,04$  W) ( $p = 0,006^{**}$ ). Die  $\Delta LTP_2$  nach Abschluss des zwölfwöchigen Trainings zeigte hingegen, ebenfalls vergleichbar mit der  $\Delta\dot{V}O_{2\max}$  T0/T2, keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Trainingsgruppen ( $p = 0,171$ ) (s. Tabelle 19).



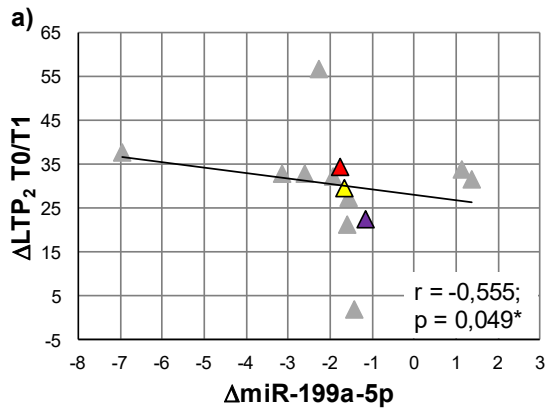
Trainings- block 1	LTP <sub>2</sub> T0 [W]	LTP <sub>2</sub> T1 [W]	ΔLTP <sub>2</sub> T0/T1 [W]	Trainings- block 2	LTP <sub>2</sub> T2 [W]	ΔLTP <sub>2</sub> T0/T2 [W]	ΔLTP <sub>2</sub> T1/T2 [W]
<b>gesamte Kohorte</b> (n = 29)	114,82 ± 16,97	133,03 ± 20,73	17,61 ± 17,08	<b>gesamte Kohorte</b> (n = 23)	140,31 ± 18,84	26,02 ± 11,88	8,37 ± 14,74
<b>HIIT-MICT</b> (n = 13)	111,34 ± 19,61	141,08 ± 19,33	27,93 ± 11,63	<b>HIIT-MICT</b> (n = 11)	139,41 ± 18,23	28,08 ± 10,16	-0,14 ± 14,04
<b>MICT-HIIT</b> (n = 16)	118,06 ± 13,61	125,4 ± 18,18	7,34 ± 13,53	<b>MICT-HIIT</b> (n = 12)	141,14 ± 19,35	22,2 ± 12,05	16,18 ± 10,42

**Tabelle 19: Erbrachte Leistung an der LT<sub>2</sub> der Probandinnen der qPCR-Analyse.** Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (±) der gesamten Kohorte sowie der beiden Trainingsgruppen. Den ersten Trainingsblock beendeten 29 Probandinnen. Dies entspricht der Kohorte „Trainingsblock 1“. Auf Grund der Covid-19-Pandemie vollendeten nur 23 Probandinnen den zweiten Trainingsblock. Dies entspricht der Kohorte „Trainingsblock 2“. Dementsprechend verkleinerte sich auch die Teilnehmerinnenzahl der einzelnen Trainingsgruppen. HIIT-MICT: Trainingsgruppe, die zunächst das sechswöchige HIIT und im Anschluss das sechswöchige MICT absolvierte; MICT-HIIT: Trainingsgruppe, die zunächst das sechswöchige MICT und anschließend das sechswöchige HIIT absolvierte; MICT: moderat-intensives kontinuierliches Training; HIIT: hochintensives Intervalltraining; LT<sub>2</sub>: zweite Laktatschwelle; ΔLTP<sub>2</sub>: Veränderung der erbrachten Leistung [W] an der zweiten Laktatschwelle zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des ersten sechswöchigen Trainingsblocks (ΔLTP<sub>2</sub> T0/T1) bzw. zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks (ΔLTP<sub>2</sub> T0/T2) bzw. zwischen Beendigung des ersten und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks (ΔLTP<sub>2</sub> T1/T2).

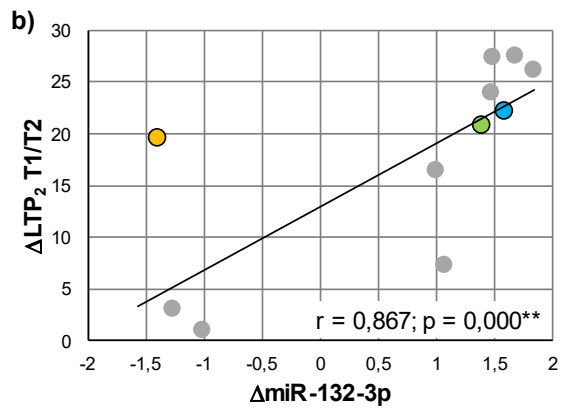
### **3.3.4 Korrelation zwischen der trainingsinduzierten $\Delta LTP_2$ und den belastungsinduzierten miRNA-Akutmustern der qPCR-Analyse**

Die signifikante Steigerung der  $LTP_2$  nach Beendigung des ersten sechswöchigen HIIT-Trainingsblocks ( $p = 0,000001^{**}$ ) zeigte eine signifikante Korrelation mit der  $\Delta miR-199a-5p$  ( $r = -0,555$ ;  $p = 0,049^*$ ) (s. Abbildung 41a). Die Durchführung eines initialen sechswöchigen MICTs führte hingegen zu keiner signifikanten Steigerung der  $LTP_2$  T0/T1 ( $p = 0,053$ ) (s. Tabelle 19). In dieser Trainingsgruppe führte jedoch das anschließende sechswöchige HIIT zu einer signifikanten Steigerung der Leistung, bei der die  $LT_2$  erreicht wurde ( $p = 0,0003^{**}$ ) und diese Veränderung korrelierte hochsignifikant mit der  $\Delta miR-132-3p$  ( $r = 0,867$ ;  $p = 0,0003^{**}$ ) (s. Abbildung 41b).

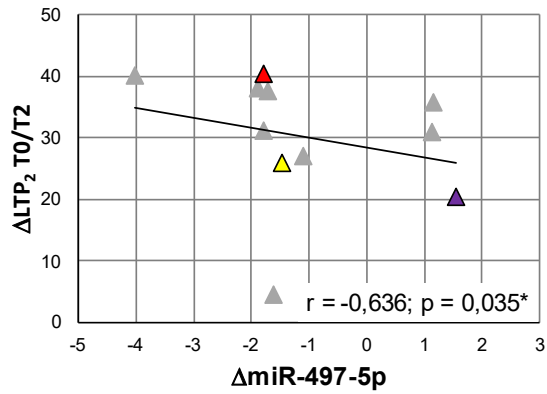
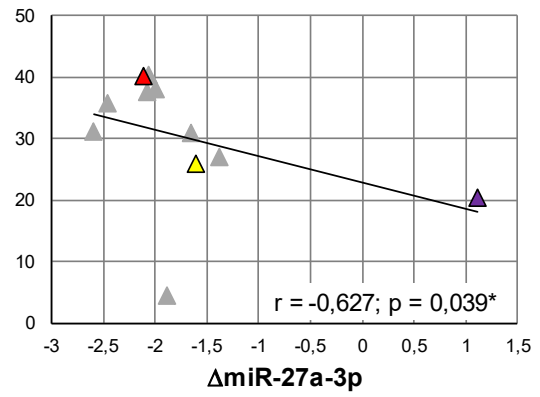
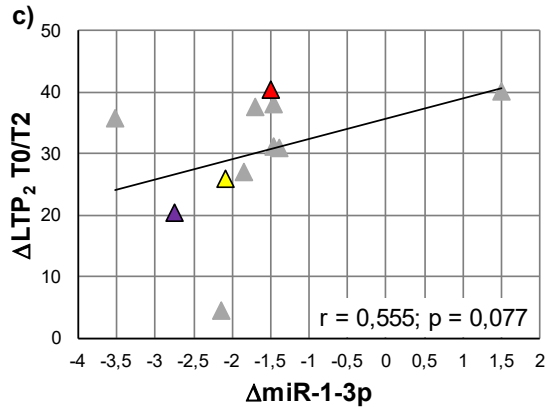
Beide Trainingsgruppen erzielten eine signifikante Steigerung der Leistung an der  $LT_2$  durch das insgesamt zwölfwöchige Trainingsprogramm (HIIT-MICT:  $p = 0,000003^{**}$  bzw. MICT-HIIT:  $p = 0,00008^{**}$ ) (s. Tabelle 19). Trotz der vergleichbaren Fitnesssteigerung der beiden Kohorten korrelierten jedoch verschiedene miRNA-Akutmuster mit der  $\Delta LTP_2$ . In der HIIT-MICT-Kohorte korrelierte die  $\Delta LTP_2$  negativ mit der  $\Delta miR-27a-3p$  ( $r = -0,636$ ;  $p = 0,039^*$ ) und der  $\Delta miR-497-5p$  ( $r = -0,636$ ;  $p = 0,035^*$ ) sowie positiv mit der  $\Delta miR-1-3p$  ( $r = 0,555$ ;  $p = 0,077$ ) (s. Abbildung 41c). In der MICT-HIIT-Trainingsgruppe korrelierte die induzierte Steigerung der  $LTP_2$  hingegen mit der  $\Delta miR-18a-5p$  ( $r = -0,510$ ;  $p = 0,09$ ) sowie mit der  $\Delta miR-133b$  ( $r = 0,510$ ;  $p = 0,09$ ) (s. Abbildung 41c). Es konnte keine Korrelation zwischen der  $\Delta LTP_2$  T0/T2 und der Veränderung der miRNA-Expression bei der Betrachtung der gesamten Kohorte ( $n = 23$ ) detektiert werden. Eine Übersicht über die Korrelationen zwischen der Veränderung der miRNA-Expression bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur und der  $\Delta LTP_2$  der verschiedenen Zeitfenster ist in Tabelle 20 aufgelistet.



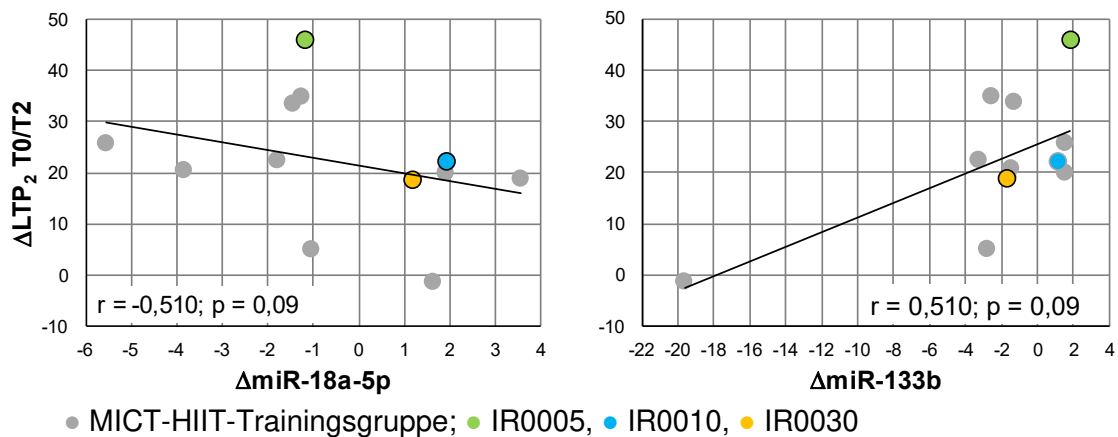
▲ HIIT-MICT-Trainingsgruppe;  
▲ IR0008, ▲ IR0012, ▲ IR00042



● MICT-HIIT-Trainingsgruppe;  
● IR0005, ● IR0010, ● IR0030



▲ HIIT-MICT-Trainingsgruppe; ▲ IR0008, ▲ IR0012, ▲ IR00042



**Abbildung 41: Korrelation zwischen der  $\Delta LTP_2$  und den belastungsinduzierten miRNA-Aktmustern der Skelettmuskulatur.** Dargestellt sind die Regressionsgeraden der miRNAs, die eine starke Korrelation ( $r = \geq 0,5$  bzw.  $\leq -0,5$ ) mit der  $\Delta LTP_2$  T0/T1 (a), mit der  $\Delta LTP_2$  T1/T2 (b) bzw. mit der  $\Delta LTP_2$  T0/T2 (c) aufwiesen. Farblich hervorgehoben sind die Werte der sechs Probandinnen, deren miRNA-Profil initial mittels Mikroarray ausgewertet wurden. Der Spearmansche Korrelationskoeffizient  $r$  sowie die jeweiligen  $p$ -Werte können den Graphen entnommen werden. Signifikante Beziehungen sind mit (\*) markiert.  $\Delta LTP_2$ : Veränderung der erbrachten Leistung [W] an der  $LT_2$  zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des ersten sechswöchigen Trainingsblocks ( $\Delta LTP_2$  T0/T1) bzw. zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks ( $\Delta LTP_2$  T0/T2) bzw. zwischen Beendigung des ersten und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks ( $\Delta LTP_2$  T1/T2).  $\Delta miRNA$ : Veränderung der miRNA-Expression in der Skelettmuskulatur in Reaktion auf eine einzelne aerobe Belastung;  $r$ : Spearmansche Korrelationskoeffizient; MICT: moderat-intensives kontinuierliches Training; HIIT: hochintensives Intervalltraining. IR-: pseudonymisierte Probandinnen-Identifikationsnummer.

	Trainingsmodalität	Zeitintervall	miRNA	Signifikanz
$\Delta\dot{V}O_2max$ [ml/kg×min]	HIIT	T0 /T1	199a-3p (+)	*
		T1/T2	x	
		T0/T2	27a-3p (-) 133a-3p (-)	
			133a-5p (-)	
	MICT	T0/T1	19b-3p (+)	*
		T1/T2	499a-5p (+)	
		T0/T2	199a-5p (+)	
			497-5p (+)	
$\Delta LTP_2$ [W]	HIIT	T0/T1	199a-5p (-)	*
		T1/T2	x	
		T0/T2	27a-3p (-) 497-5p (-)	* *
			1-3p (+)	
	MICT	T0/T1	x	
		T1/T2	132-3p (+)	**
		T0/T2	18a-5p (-)	
			133b (+)	

**Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse der qPCR-Korrelationsanalysen.** Aufgeführt sind die Korrelationen der miRNAs, die potenzielle Prädiktoren der individuellen Trainingsreaktion darstellen könnten: miR-1-3p, miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-27a-3p, miR-132-3p, miR-133a-3p/-5p, miR-133b, miR-199-3p/-5p, miR-499a-5p, miR-497-5p.  $\dot{V}O_2max$ : maximale Sauerstoffaufnahme [ml/kg×min];  $LTP_2$ : erbrachte Leistung an der zweiten Laktatschwelle [W]; HIIT: hochintensives Intervalltraining; MICT: moderat-intensives kontinuierliches Training; (-): negative Korrelation; (+) positive Korrelation. Das Zeichen (\*) markiert eine signifikante, (\*\*) markiert eine hochsignifikante Korrelation; T0/T1: Veränderung zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des ersten sechswöchigen Trainingsblocks; T0/T2: Veränderung zwischen Trainingsbeginn und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks; T1/T2: Veränderung zwischen Beendigung des ersten und Beendigung des zweiten sechswöchigen Trainingsblocks.

### 3.4 KEGG-Signalweganalyse der korrelierenden miRNAs der qPCR-Untersuchung

Die beschriebenen Ergebnisse deuten auf ein komplexes Zusammenspiel zwischen der sportlichen Trainierbarkeit und der akuten, belastungsinduzierten Regulation des miRNA-Profiles hin. Zur Generierung eines detaillierteren Verständnis zur Rolle der miRNAs in der trainingsinduzierten Adaptation wurde mit Hilfe der Datenbank TarBase v7.0 der *Online*-Plattform DIANA-mirPath v3.0 die Funktion der miRNAs, die eine starke Korrelation ( $r \geq 0,5$  bzw.  $r \leq -0,5$ ) mit der Veränderung der physiologischen Parameter ( $\dot{V}O_2\text{max}$ ,  $LTP_2$ ) aufwiesen (miR-1-3p, miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-27a-3p, miR-132-3p, miR-133a-3p, miR-133a-5p, miR-133b, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p, miR-499a-5p), näher untersucht (s. Tabelle 21).

Insgesamt zeigte sich eine Beteiligung dieser miRNAs an 28 Signalwegen, von denen 13 bekanntermaßen an der trainingsinduzierten Adaptation der Skelettmuskulatur mitwirken.

Besonders hervorzuheben ist hierbei die regulatorische Funktion von miR-27a-3p und miR-199a-3p bei der Fettsäurebiosynthese. Darüber hinaus ist die Beteiligung von miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-27a-3p, miR-132-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p sowie miR-499a-5p im TGF $\beta$ -, p53-, FOXO-, AMPK- und mTOR-Signalweg sowie der Hippo-Signalkaskade in den Fokus zu stellen. Diese Signalwege beeinflussen maßgeblich den muskulären Metabolismus u. a. durch Regulation der Muskelproteinsynthese, der Regeneration und Differenzierung von Muskelzellen sowie der mitochondrialen Biogenese (s. Kapitel 1.1.2) (De Angelis et al., 1998; Goodman et al., 2015; Judson et al., 2012; Liu et al., 2001; Liu et al., 2004; Mendez et al., 1997; Saleem et al., 2014; Sandri et al., 2004; Sartorelli & Fulco, 2004; Sartori et al., 2009; Stitt et al., 2004). MiR-18a-5p, miR-27a-3p, miR-132-3p und miR-497-5p scheinen zudem an der Regulation der Lysin-Degradation beteiligt zu sein. Lysin fördert das Muskelwachstum sowie die Proteinsynthese und die Degradation dieser Aminosäure wirkt diesen Prozessen entgegen (Jin et al., 2019).

Die Analyse ergab zudem, dass die untersuchten miRNAs weiterhin in die Kontrolle elementarer zellulärer Funktionen involviert sind, einschließlich der

Regulation des Zellzyklus, der Proteinprozessierung, der Dynamik von Zell-Zell-Verbindungen und der Interaktion von Zellen mit der Extrazellulärmatrix (ECM).

	Signalweg	p-Wert	Gene ges.	miRNA	Gene je miRNA
<b>1</b>	Fettsäurebiosynthese (hsa00061)	$<1e^{-325}$	3	-27a-3p -199a-3p	3 1
<b>2</b>	ECM-Rezeptor-Interaktionen (hsa04512)	$<1e^{-325}$	32	-19b-3p -27a-3p -199a-5p -497-5p	12 21 7 12
<b>3</b>	Proteoglykane in Krebs (hsa05205)	$<1e^{-325}$	106	-19b-3p -27a-3p -132-3p -199a-3p -199a-5p -497-5p	35 53 19 22 12 42
<b>4</b>	Hippo-Signalweg (hsa04390)	$1,11e^{-16}$	72	-18a-5p -27a-3p -132-3p -199a-5p -497-5p	19 42 15 7 27
<b>5</b>	Virale Karzinogenese (hsa05203)	$2,12e^{-08}$	76	-18a-5p -19b-3p -27a-3p	18 31 53
<b>6</b>	TGF $\beta$ -Signalweg (hsa04350)	$1,71e^{-09}$	47	-18a-5p -19b-3p -27a-3p -132-3p -199a-5p -497-5p	6 12 33 11 6 13
<b>7</b>	Prionen-Erkrankungen (hsa05020)	$4,14e^{-07}$	10	-27a-3p	10
<b>8</b>	Gliom (hsa05214)	$7,66e^{-07}$	36	-19b-3p -27a-3p -497-5p	15 22 18
<b>9</b>	chronisch-myeloische Leukämie (hsa05220)	$5,82e^{-05}$	44	-19b-3p -27a-3p -497-5p	15 28 18
<b>10</b>	Adhärenzverbindungen (hsa04520)	0,0002	37	-27a-3p -199a-5p	22 7

	Signalweg	p-Wert	Gene ges.	miRNA	Gene je miRNA
				-497-5p	16
11	p53-Signalweg (hsa04115)	0,0002	38	-18a-5p -19b-3p -27a-3p -497-5p -499a-5p	11 18 21 18 4
12	Zellzyklus (hsa04110)	0,0006	49	-18a-5p -27a-3p -132-3p -499a-5p	14 35 17 7
13	FOXO-Signalweg (hsa04068)	0,0008	64	-19b-3p -27a-3p -497-5p	29 38 27
14	Lysin-Degradation (hsa000310)	0,0016	23	-18a-5p -27a-3p -132-3p -497-5p	6 14 4 9
15	Bakterieninvasion in Epithelzellen (hsa05100)	0,0021	31	-27a-3p	31
16	Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum (hsa4141)	0,0028	68	-27a-3p -497-5p	46 43
17	Hepatitis B (hsa05161)	0,0033	64	-19b-3p -27a-3p -497-5p	26 36 24
18	kolorektal Karzinom (hsa05210)	0,0052	35	-19b-3p -27a-3p -199a-5p -497-5p	13 20 7 13
19	mTOR-Signalweg (hsa04150)	0,0053	34	-27a-3p -497-5p	22 18
20	Prostatakarzinom (hsa05215)	0,0067	48	-19b-3p -27a-3p -497-5p	20 29 22
21	Signalwege in Krebs (hsa05200)	0,0072	133	-18a-5p -27a-3p -497-5p	26 89 55



	Signalweg	p-Wert	Gene ges.	miRNA	Gene je miRNA
22	Blasenkarzinom (hsa05219)	0,0087	23	-18a-5p -19b-3p -27a-3p -497-5p	8 10 14 12
23	Schilddrüsenkarzinom (hsa05216)	0,0125	13	-27a-3p	13
24	Melanom (hsa05218)	0,0128	32	-19b-3p -27a-3p -497-5p	16 18 15
25	AMPK-Signalweg (hsa04152)	0,015	53	-19b-3p -27a-3p	22 43
26	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (hsa05223)	0,0161	29	-19b-3p -27a-3p -497-5p	12 17 14
27	Signalwege, die pluripotente Stammzellen regulieren (hsa04550)	0,0191	63	-19b-3p -27a-3p -497-5p	24 38 23
28	Pankreaskarzinom (hsa05212)	0,4266	34	-19b-3p -27a-3p -497-5p	13 19 17

**Tabelle 21: KEGG-Signalweganalyse der korrelierenden miRNAs der qPCR-Korrelationsanalysen.** Die Signalweganalyse wurde mit Hilfe der Datenbank TarBase v7.0 der *Online*-Plattform DIANA-miRPath v3.0 durchgeführt (Vlachos et al., 2015). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; (hsa-): KEGG-Signalweg-Identifikationsnummer; ECM: Extrazellulärmatrix; FOXO: Forkhead-Box-Protein O; AMPK: AMP-aktivierte Proteinkinase; mTOR: mechanistic target of rapamycin; TGF $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$ ; ges.: gesamt.

## 4 Diskussion

Die zunehmende Forschung auf dem Gebiet der miRNA-Biologie liefert fortlaufend neue Erkenntnisse über die Funktion und die regulatorischen Mechanismen, in die diese kleinen, nichtkodierenden RNAs involviert sind. Eine Vielzahl an Studien untersuchte in der Vergangenheit bereits die Rolle von miRNAs bei der Entwicklung, Plastizität und trainingsinduzierten Adaptation der Skelettmuskulatur (Fochi et al., 2020; Ultimo et al., 2018). Dennoch sind die Kenntnisse über die Funktion von miRNAs bei der Regulation des Trainingsansprechens nach wie vor limitiert und die stetige Identifizierung neuer miRNA-Spezies verdeutlicht die Komplexität dieses epigenetischen Regulationsmechanismus. Auf Grund der trainingsinduzierten Veränderung der miRNA-Expression (Kirby & McCarthy, 2013; Zacharewicz et al., 2013) kristallisierten sich miRNAs in den letzten Jahren immer mehr als potenzielle Biomarker für die Gestaltung individualisierter Trainingspläne heraus. Die Identifizierung molekularer Prädiktoren für die Vorhersage individueller Trainingsreaktionen ist dabei in hohem Maße relevant, da auch bei standardisierten Trainingsinterventionen das physiologische Trainingsansprechen außerordentlich heterogen ist (Bouchard et al., 1999; Lortie et al., 1984; Prud'homme et al., 1984). Dies ist sowohl im Wettkampfsport als auch in rehabilitativen/therapeutischen Bereichen relevant. Daher sollten in dieser Arbeit miRNAs identifiziert werden, die gute Kandidaten für die Vorhersage der individuellen Trainingsreaktion sein könnten. Hierfür wurden zunächst sechs Probandinnen der Trainingsstudie iReAct ausgewählt, um das miRNA-Muster bei der Akutantwort auf eine standardisierte Belastung in Skelettmuskelproben mittels Mikroarray zu analysieren. Hierdurch konnte ein generalisierter Einblick in die Veränderung der entsprechenden miRNA-Expressionsmuster generiert und diese mit der späteren Trainingsanpassungsreaktion korreliert werden (s. Kapitel 3.1.3). In einer größeren Kohorte (n = 29) wurde nachfolgend die Eignung dieser miRNAs für die Erstellung von individualisierten Trainingsprogrammen in qPCR-Experimenten weiterführend untersucht und auf diese Weise auch die Vergleichbarkeit zwischen der Mikroarray- und der qPCR-Methodik analysiert.

## **4.1 Diskussion der miRNA-Analyse**

### **4.1.1 Vergleich der Mikroarray-Ergebnisse mit einschlägigen Literaturdaten**

Der erste Schritt dieser Arbeit war es, die Mikroarray-Daten in den Kontext einschlägiger Literaturdaten zu setzen (s. Kapitel 3.1.1). Daher wurden die Akutmuster verschiedener miRNAs analysiert, die zuvor in Reaktion auf eine einzelne aerobe Belastung in der Skelettmuskulatur als differenziell exprimiert beschrieben worden waren. Hierbei zeigten sich maßgebliche Differenzen, die im Folgenden skizziert und diskutiert werden sollen.

In der Mikroarray-Analyse (n = 6) wurde eine signifikante Repression der myomiRs miR-1(-3p), miR-133a-3p/-5p, miR-133b sowie miR-499a-5p detektiert (s. Kapitel 3.1.1). Diese Suppression bestätigte sich auch in der Gesamtkohorte (n = 29) in der qPCR-Untersuchung (s. Kapitel 3.2.5). Dies steht im Kontrast zu anderen Studienergebnissen, die die miRNA-Expression nach einer akuten aeroben Belastung analysierten. Diese zeigten eine Zunahme von miR-1(-3p) (Nielsen et al., 2010; Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009), miR-133a-3p/-5p (Nielsen et al., 2010; Russell et al., 2013) sowie miR-133b (Russell et al., 2013) (s. Tabelle 22).

Desgleichen zeigte sich in der Mikroarray-Untersuchung eine entgegengesetzte Regulation von miR-181a-5p, miR-107, miR-128-3p, miR-21-5p sowie miR-378a-5p im Vergleich zu früher publizierten Daten (s. Kapitel 3.1.1 und Tabelle 22). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reduktion dieser miRNA-Spezies detektiert, wohingegen in der Literatur eine Zunahme ihrer Expression beschrieben wurde (McGivney et al., 2017; McLean et al., 2015; Russell et al., 2013; Safdar et al., 2009). Russell et al. (2013) postulierten zudem eine Repression von miR-9(-5p) und miR-31(-5p) bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur, während in dem in dieser Arbeit analysierten Kollektiv keine Veränderung der Expression dieser beiden miRNA-Spezies nach einer akuten Ausdauerbelastung in der Skelettmuskulatur festgestellt werden konnte (s. Kapitel 3.1.1 und Tabelle 22).

Eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und Literaturdaten konnte nur für eine geringe Anzahl an miRNA-Spezies beobachtet

werden. In Einklang mit den Ergebnissen von Russel et al. (2013) und Safdar et al. (2009) zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Repression von miR-23a-3p. Zudem zeigte miR-206, wie bereits von Russel et al. (2013) und Nielsen et al. (2010) beschrieben, keine Veränderung bei der Akutantwort.

Ein direkter Vergleich von Studiendaten wird jedoch durch Unterschiede der physiologischen und anthropometrischen Charakteristika wie beispielsweise Alter, Geschlecht, Ethnie und Trainingsstatus der Testpersonen erschwert. Zudem existieren humane und Tierstudien, wobei nicht immer eine enge Korrelation zwischen Tier- und Humandaten besteht. In etlichen Studien wurden altersabhängige Differenzen bei der miRNA-Regulation beschrieben (Drummond et al., 2008; Hamrick et al., 2010; Zacharewicz et al., 2014), welche mit der im Alter auftretenden reduzierten Regenerationsfähigkeit und reduzierten Proteinsynthese der Skelettmuskulatur in Zusammenhang stehen könnten (Kumar et al., 2009; Rivas et al., 2014). Zudem scheint der Trainingsstatus maßgeblich die molekulare Reaktion auf einen Belastungsreiz zu determinieren. Zahlreiche Studien zeigten Unterschiede in der muskulären Proteinmenge und/oder dem Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine in trainierten und untrainierten Individuen. Diese Proteine sind regulatorisch an Signalwegen der Trainingsanpassung beteiligt, wie beispielsweise dem AKT-mTORC1-Signalweg (Fernandez-Gonzalo et al., 2013; Moberg et al., 2020; Wilkinson et al., 2008). Dies legt nahe, dass sich auch das miRNA-Profil zwischen trainierten und untrainierten Personen unterscheiden könnte, da eine Vielzahl an miRNAs maßgeblich in den Prozess der Trainingsadaptation einzugreifen scheint (s. Kapitel 1.2.3).

Schließlich existieren bisher nur wenige Studien, die die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der miRNA-Regulation analysierten (Ameling et al., 2015; Guo et al., 2016; Mishima et al., 2008). Diese Daten zeigen jedoch einschneidende Unterschiede der miRNA-Profile in Abhängigkeit der Geschlechter. Daher stellt auch das unterschiedliche Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Testpersonen einen Erklärungsansatz für die beobachteten Differenzen dar. Darüber hinaus unterscheiden sich die angewandten Trainingsinterventionen in Dauer, Intensität und Modalität. Diese Variablen können jedoch das miRNA-Profil

erheblich beeinflussen. Widmann et al. (2022) verglichen die Expression von miR-21-5p sowie miR-503-5p in Reaktion auf ein sechswöchiges MICT bzw. HIIT und konnten deutliche Differenzen zwischen den beiden Trainingsgruppen nachweisen.

Des Weiteren existieren keine einheitlichen Richtlinien dahingegen, welcher Zeitraum nach einer körperlichen Belastung die Akutantwort der Skelettmuskulatur definiert. Nielsen et al. (2010) beschrieben eine akute Veränderung des miRNA-Musters (miR-1(-3p), miR-133a) unmittelbar im Anschluss an eine einstündige Ausdauerübung, zeigten jedoch auch, dass bereits 3 h nach der Intervention keine signifikante Veränderung der miRNA-Expression mehr gemessen werden konnte. Daher scheint für die Interpretation der Daten der Zeitpunkt der Biopsieentnahme nach der Trainingsintervention entscheidend zu sein, was einen weiteren limitierenden Faktor für die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse darstellt.

In den meisten Studien wurde nur eine begrenzte Anzahl an miRNAs analysiert. Tatsächlich existiert bis *dato* nur eine (der Autorin bekannte) Studie, die umfassend die Veränderungen im miRNA-Profil in Reaktion auf eine akute aerobe Belastung untersuchte (McLean et al., 2015). Die in den verschiedenen Studien angewandten experimentellen Techniken variieren zudem erheblich. So kann die Detektion der qPCR-Fluoreszenzsignale während der Amplifikation mittels SYBR Green I oder TaqMan-Sonden erfolgen. Zudem weisen die in dieser Arbeit eingesetzten LNA-Oligonukleotid-*Primer* eine erhöhte Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu herkömmlichen DNA-qPCR-*Primern* auf (Latorra et al., 2003) (s. Kapitel 4.2.2). Des Weiteren lassen sich cDNA- von Oligonukleotid-Mikroarrays unterscheiden, die darüber hinaus von den unterschiedlichsten Herstellern angeboten werden (Mah et al., 2004). Ein direkter Vergleich der Daten wird zudem durch die unterschiedlichen Methoden, Protokolle und Normalisierungsstrategien zur Detektion der miRNA-Expression erschwert (s. Tabelle 22). Die gewählte Normalisierungsstrategie beeinflusst jedoch in hohem Maße die analytische Auswertung der Daten und kann somit zu differierenden Ergebnissen zwischen einzelnen Studien führen (Faraldi et al., 2019). Spezifisch kann die Normalisierung der gemessenen Fluoreszenzsignale

entweder durch den Einsatz exogener Oligonukleotide (*spike-ins*), die in einer definierten Konzentration zu dem PCR-Reaktionsgemisch hinzugegeben werden, oder anhand von endogenen miRNAs, wie in dieser Arbeit, erfolgen. Darüber hinaus variiert die Anzahl sowie die Spezies der eingesetzten Referenzmoleküle; so wurde in dieser Arbeit das geometrische Mittel aus drei Referenz-miRNAs (SNORD48a, SNORD49, miR-423-3p) zur Normalisierung der Fluoreszenzsignale angewandt, wohingegen in vergleichbaren Studien häufig nur eine bis zwei endogene Kontrollen eingesetzt wurden, die sich darüber hinaus zwischen den verschiedenen Studien unterschieden (beispielsweise SNORD48a (Nielsen et al., 2010; Russell et al., 2013), 5S-rRNA (Drummond et al., 2009), RNU6 (Safdar et al., 2009), SNORD48a plus 18S-rRNA (Margolis et al., 2017)).

Referenz	Spezies (H/M) n - w/m	Programm	T	miRNA-Spezies					
Daten dieser Arbeit	H  n = 6 w: 6 m: 0	Fahrrad-ergometer 10 min 90 % LT <sub>1</sub> 50 min zw. LT <sub>1</sub> & LT <sub>2</sub>  Gesamt: 60 min	2 h	miR-1-(3p)	miR-133a-3p	miR-133a-5p	miR-133b	miR-206	miR-499a-5p
				miR-9-5p	miR-10a-5p	miR-23a-3p	miR-29a-3p	miR-29b-3p	miR-29c-3p
				miR-30a-3p	miR-30a-5p	miR-31-5p	miR-128-3p	miR-181a-5p	miR-378a-3p
				miR-378a-5p	miR-378g	miR-532-5p			
				Methode					
Russel et al. (2013)	H  n = 9 w: 0 m: 9	Fahrrad-ergometer 70 % VO <sub>2</sub> max Peak  Gesamt: 60 min	3 h	miR-1-(3p)	miR-133a-3p	miR-133a-5p	miR-133b	miR-206	
				miR-9-5p	miR-23a-(3p)	miR-23b	miR-29a-(3p)	miR-29b-(3p)	miR-29c-(3p)
				miR-31-(5p)	miR-181a-5p				
				Methode					

Referenz	Spezies (H/M) n - w/m	Programm	T	miRNA-Spezies					
Nielsen et al. (2010)	H n = 10 w: 0 m: 10	Fahrrad-ergometer 65 % P(max)  Gesamt: 60 min	0 h	miR-1-(3p)	miR-133a-3p	miR-133a-5p	miR-133b	miR-206	
				Methode					
Safdar et al. (2009)	M n = 7 w: 0 m: 7	Laufstad 15 m/min für 90 min  Gesamt: 90 min	3 h	miR-1-(3p)	miR-133a-3p	miR-133a-5p			
				miR-23a-(3p)	miR-107	miR-181a-5p			
Methode						qPCR TaqMan Assay (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)			
McLean et al. (2015)	H n = 14 w: 5 m: 9	Fahrrad-ergometer vier Durchläufe: 8 min 70 % HF(max) 2 min 90 % VO <sub>2</sub> Peak 2 min Pause  Gesamt: 48 min	30 min	miR-10a-5p	miR-22-3p	miR-30a-5p	miR-30d-5p	miR-128-3p	miR-378a-3p
				miR-378a-5p	miR-378f	miR-378g	miR-378i	miR-422a	miR-532-5p
Methode						4x44K Whole Human Genome Mikroarray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)			

**Tabelle 22: Vergleich einschlägiger Literaturdaten mit den Mikroarray-Ergebnissen der miRNA-Akutanantwort in der Skelettmuskulatur.** Dargestellt sind Studiencharakteristika, die die Vergleichbarkeit der Studien untereinander limitieren. Diese beinhalten die untersuchte Spezies, das Geschlechterverhältnis, die Art und Dauer der Trainingsintervention, den Zeitpunkt der Biopsieentnahme sowie die experimentelle Methodik. Spezies (H/M): Spezies (human/Maus); w/m: Geschlecht weiblich/männlich; n: Testpersonenanzahl; LT<sub>1</sub> bzw. LT<sub>2</sub>: erste bzw. zweite Laktatschwelle; HF(max): maximale Herzfrequenz [bpm]; VO<sub>2</sub>max: maximale Sauerstoffaufnahme [ml/kg×min]; P(max): maximale Leistung [W]; T: Zeitpunkt der Biopsieentnahme nach der akuten aeroben Belastung; rot markiert eine Abnahme, grün markiert eine Zunahme der miRNA-Expression nach einer akuten aeroben Belastung; orange markiert miRNAs, deren Expression keine Veränderung durch eine einzelne aerobe Belastung zeigte.

#### **4.1.2 Funktionelle Rolle der differenziell exprimierten miRNAs**

In der weiteren Analyse wurde eine *Fold change*-Analyse durchgeführt, um diejenigen miRNAs zu identifizieren, die bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur differenziell exprimiert waren (s. Kapitel 3.1.2). Die Festlegung eines Schwellenwerts zur Identifizierung unterschiedlich exprimierte Gene bzw. miRNAs ist jedoch eine intuitive Methode, da keine einheitliche Definition darüber existiert, welcher Schwellenwert eine tatsächlich differenzielle Expression markiert (Vaes et al., 2014). Häufig wird ein Schwellenwert von  $\pm 2$  für die Definition einer differenziell exprimierten miRNA gewählt (Zhao et al., 2018). In der hier durchgeführten Mikroarray-Analyse zeigten 326 miRNAs eine *Fold change* größer Faktor zwei. Die Analyse dieser Anzahl an miRNAs hätte den zeitlichen Rahmen der hier vorliegenden Arbeit überschritten. Daher wurde ein Schwellenwert von  $\pm 4,5$  für die *Fold change* gewählt. Mithilfe dieses Ansatzes wurden mehrere miRNAs identifiziert, die zuvor mit der Angiogenese (miR-10a-5p (Wang et al., 2016), miR-15a-5p (Yin et al., 2012), miR-18a-5p (Suárez et al., 2008), miR-19b-3p (Suárez et al., 2008; Suárez & Sessa, 2009), miR-126-3p (Suárez & Sessa, 2009), miR-132-3p (Anand et al., 2010), miR-155-5p (Suárez et al., 2008), miR-199a-3p/-5p (Joris et al., 2018)), der mitochondrialen Biogenese (miR-27a-3p (Kang et al., 2013)), der Inflammation (miR-155-5p (McCoy et al., 2010; Onodera et al., 2018), miR-10a-5p (Pham et al., 2020), miR-29c-3p (Tarnowski et al., 2021)), der Muskelfasertyp-Konversion (miR-27a-3p (Chemello et al., 2019), miR-152-3p (Zhang et al., 2019), miR-30e-3p (Jia et al., 2017)) sowie dem AKT-mTORC1-Signalweg (miR-19b-3p (Rivas et al., 2021; Zhu et al., 2019), miR-128-3p (Singh et al., 2020), miR-126-3p (Rivas et al., 2014), miR-1(-3p) (Hitachi & Tsuchida, 2013), miR-133a (Hitachi & Tsuchida, 2013), miR-199a-3p (Jia et al., 2013), miR-199a-5p (Joris et al., 2018), miR-363-3p (Meyer et al., 2015; Shu et al., 2020)) in Verbindung gebracht wurden. Für eine Reihe der differenziell exprimierten miRNAs wurde zudem eine Beteiligung an der Myogenese (Myoblasten-Proliferation und/oder Myoblasten-Differenzierung) (miR-19b-3p (Kong et al., 2019), miR-29c-3p (Faraldi et al., 2019; Silva et al., 2019), miR-30e-3p (Jia et al., 2017), miR-1(-3p) und miR-133a/b (Güller & Russell, 2010), miR-192-5p (Zhao et al., 2016), miR-660-5p



(Faraldi et al., 2019) sowie miR-199a-5p, miR-128-3p, miR-155-5p und miR-499a-5p (Fochi et al., 2020)) beschrieben. Des Weiteren scheint die miRNA-Spezies miR-19b-3p den muskulären Glukosemetabolismus durch Erhöhung der Glukoseaufnahme in die arbeitende Muskulatur sowie Erhöhung der Glukoseoxidation zu regulieren (Massart et al., 2021). Neben den beschriebenen regulatorischen Funktionen von miR-27a-3p bei der mitochondrialen Biogenese (McLean et al., 2015; Safdar et al., 2011), der Fettsäureoxidation (Chemello et al., 2019), der Fasertyp-Konversion (Chemello et al., 2019) und der Muskelregeneration (Chen et al., 2013; Huang et al., 2012), wurde darüber hinaus eine inverse Beziehung zwischen der miR-27a-3p-Expression und der Aktivität des Runt-related Transkriptionsfaktors 1 (RUNX-1), welcher zu einer Förderung der Erythropoese führt, beschrieben (Keller et al., 2011; Yokomizo et al., 2008). Daher könnte die Suppression von miR-27a-3p mit einer erhöhten Sauerstofftransportkapazität und somit einer erhöhten Leistungsfähigkeit der Muskulatur einhergehen.

Des Weiteren zeigte die KEGG-Signalweganalyse mit Hilfe der DIANA-TarBase-Datenbank eine Beteiligung mehrerer verschiedener, bei der Akutantwort sowohl induzierter (miR-155-5p, miR-1126-5p, miR-2110) als auch reprimierter miRNAs (miR-10a-5p, miR-15a-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30e-5p, miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-363-3p, miR-660-5p) am Fettsäuremetabolismus und der Fettsäurebiosynthese. Während eines niedrig- bis moderat-intensiven Trainings stellen freie Fettsäuren eine der Hauptenergiequellen der arbeitenden Muskulatur dar (s. Kapitel 1.1.1). Zudem ist die Erholungsphase nach einem Training im Allgemeinen durch die Einsparung von Glukose und parallel erhöhter Fettsäureoxidation gekennzeichnet (Egan & Zierath, 2013; Kiens & Richter, 1998). Die beschriebenen miRNAs könnten daher die Trainingsreaktion durch Regulation der Substratutilisation steuern. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zudem eine Überlegenheit an miRNAs, die bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur reprimiert wurden, im Gegensatz zu solchen, die induziert wurden. In der Regel führen miRNAs zu einer Inhibition der Transkription ihrer Zielgene (Bartel, 2009), somit müsste die Suppression einer miRNA-Spezies in der Theorie zu einer gesteigerten Aktivität der Zielproteine führen. Die KEGG-

Signalweganalyse zeigte, dass eine Reihe der reprimierten miRNAs an der Regulation des FOXO- sowie p53-Signalwegs beteiligt zu sein scheinen (miR-15a-5p, miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-3p, miR-30e-3p, miR-30e-5p, miR-106-5p, miR-497-5p, miR-499a-5p, miR-660-5p). FOXO fördert die Umstellung des Energiestoffwechsels in der Skelettmuskulatur von der Glukose- auf die Lipidoxidation, indem es eine gesteigerte Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-4 (PDK-4) induziert. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist durch die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität sowie die Aktivierung der mitochondrialen Biogenese ein integraler Bestandteil des trainingsinduzierten Signaltransduktionsnetzwerks (Matoba et al., 2006; Saleem & Hood, 2013). Durch Induktion eines Zellzyklusarrests wird dabei die Reparatur von DNA-Schäden, die durch kontraktionsstimulierte Emissionen von ROS entstehen, ermöglicht (Achanta et al., 2005; Wang et al., 2012). Zusätzlich fördert p53 die Fettsäureoxidation und die oxidative Phosphorylierung (Hu et al., 2010; Park et al., 2009; Wang et al., 2012). Durch diese Prozesse könnten die Signalmoleküle der FOXO- und p53-Signalkaskaden die Anpassungsreaktionen an ein ausdauerbasiertes Training regulieren. Des Weiteren wurden in der DIANA-Signalweganalyse im Rahmen dieser Arbeit Hinweise darauf gefunden, dass eine Reihe der reprimierten miRNAs Zielgene aufweisen, die für Faktoren des Hippo-Signalwegs kodieren (miR-10a-5p, miR-15a-5p, miR-18a-5p, miR-22-5p, miR-29c-3p, miR-30a-3p, miR-30e-3p, miR-192-5p, miR-199a-5p, miR-497-5p) (Vlachos et al., 2015). Durch die Aktivität des Effektorproteins YAP wird zum einen die Proteinsynthese und das Muskelwachstum angeregt (Watt et al., 2015), zum anderen gibt es aber auch Hinweise darauf, dass YAP die Fettsäureoxidation und somit die oxidative Energiegewinnung in der Skelettmuskulatur fördert (Watt et al., 2021). Allerdings muss in zukünftigen Studien analysiert werden, welche funktionelle Konsequenz aus der Repression der genannten miRNAs resultiert. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass die MST-1 (mammalian sterile 20-like Kinase 1), welche die Aktivität von YAP negativ reguliert, durch miR-199a-5p inhibiert wird (Li et al., 2020).

In der unmittelbaren Erholungsphase wenige Stunden nach der körperlichen Belastung steht die Wiederherstellung der zellulären Homöostase im

Vordergrund (Egan & Zierath, 2013). Durch die Regulation elementarer zellulärer Funktionen, einschließlich von ECM-Rezeptor-Interaktionen (miR-19b-3p, miR-27a-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p) und Adhäsionsverbindungen (miR-27a-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p), der Proteinprozessierung im endoplasmatischen Retikulum (miR-27a-3p, miR-497-5p) sowie der Zellzykluskontrolle (miR-18a-5p, miR-27a-3p, miR-499a-5p), könnte eine Vielzahl der bei der Akutantwort reprimierten miRNAs an der Regulation von Prozessen der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt sein (s. Kapitel 3.1.4, Tabelle 13).

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie können jedoch keine definitiven Aussagen über die funktionelle Bedeutung der analysierten miRNAs getroffen werden. Die durch miRNAs kontrollierten zellulären Funktionen bilden ein komplexes Netzwerk, da verschiedene Zielmoleküle durch mehrere miRNAs beeinflusst werden können und gleichzeitig einzelne miRNAs auf hunderte von mRNA-Transkripte abzielen können (Krek et al., 2005). Außerdem bestimmt die Summe aus inhibitorischen und aktivierenden Signalen die tatsächliche Reaktion auf einen physiologischen Stimulus, sodass aus der Analyse einzelner miRNAs nicht auf das resultierende Ergebnis geschlossen werden kann. Für die Validierung der funktionellen Zusammenhänge zwischen einzelnen miRNAs untereinander und ihren Zielmolekülen müssen funktionsbezogene Experimente, beispielsweise anhand von *knockout*-Mäusen, durchgeführt werden und/oder das Genexpressionsprofil simultan mit dem miRNA-Profil analysiert werden. Darüber hinaus sollten in zukünftigen Studien bioinformatische Datenanalysen angewandt werden, um die Komplexität dieses Netzwerks funktioneller Interaktionen detaillierter zu verstehen.

#### **4.1.3 Potenzial der miRNAs als prognostische molekulare Marker der individuellen Trainingsreaktion**

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Veränderung der miRNA-Expression in Reaktion auf eine einzelne aerobe Belastung eine starke interindividuelle Variabilität aufweist (s. Kapitel 3.2.5). Aus diesem Grund könnten miRNAs geeignete Biomarker für die Vorhersage der individuellen Trainingsreaktion darstellen und in der Zukunft gegebenenfalls für die Erstellung personalisierter

Trainingspläne verwendet werden. Um sich diesem Ziel zu nähern, wurden die miRNA-Profile bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur der einzelnen Probandinnen mit den individuellen physiologischen Veränderungen ( $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ ,  $\Delta\text{LTP}_2$ ) nach einem standardisierten Trainingsprogramm korreliert (s. Kapitel 3.3). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zunahme der individuellen Fitness in Reaktion auf verschiedene Trainingsformen (HIIT vs. MICT) möglicherweise tatsächlich anhand unterschiedlicher miRNA-Akutmuster prognostiziert werden kann.

In den Korrelationsanalysen zwischen der Veränderung der physiologischen Parameter und der Veränderung der miRNA-Expression bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur kristallisierten sich insbesondere miR-199a-3p, miR-199a-5p sowie miR-19b-3p als interessante Kandidaten für die Vorhersage der individuellen Trainingsreaktion heraus. MiR-199a-3p und -5p könnten hierbei potenzielle Biomarker für das Ansprechen auf ein hochintensives Ausdauertraining sein, wohingegen miR-19b-3p einen potenziellen Prädiktor für die Leistungssteigerung durch ein moderat-intensives aerobes Training darstellt (s. Kapitel 3.3). Die beiden miR-199a-Spezies werden gemeinsam transkribiert, jedoch wird nur ein Strang für die Bildung des RISCs aktiviert, während der zweite abgebaut wird (s. Kapitel 1.2.1). Die positive Korrelation zwischen der  $\Delta\text{miR-199a-3p}$  und der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  sowie die negative Korrelation zwischen der  $\Delta\text{miR-199a-5p}$  und der  $\Delta\text{LTP}_2$  im Anschluss an ein sechswöchiges HIIT könnte darauf hindeuten, dass ein Zusammenhang zwischen der präferentiellen Prozessierung der miR-199a-3p-Spezies bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur und einer stärkeren Zunahme der aeroben Trainingsleistung bestehen könnte. Darüber hinaus korrelierte die  $\Delta\text{miR-499a-5p}$  bzw. die  $\Delta\text{miR-132-3p}$  mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max T1/T2}$  bzw. der  $\Delta\text{LTP}_2 \text{ T1/T2}$ , die sich in Reaktion auf das HIIT zeigte, das im Anschluss an das initiale MICT durchgeführt wurde. Diese beiden miRNAs könnten daher ebenfalls potenzielle Prädiktoren für das Ansprechen auf ein mehrwöchiges Ausdauertraining sein. Jedoch wurde keine Trainingspause (sogenannte *Washout*-Periode) zwischen den beiden Trainingsblöcken durchgeführt, wodurch es zu sogenannten Übertragungseffekten kommt. Das bedeutet, dass die erzielten Wirkungen durch die Effekte

beider Trainingsblöcke beeinflusst werden, und dass das Resultat nach Abschluss des zwölfwöchigen Trainingsprogramms nicht mehr auf eine spezifische Trainingsmodalität zurückgeführt werden kann.

Auf Grund der fehlenden Trainingspause zwischen den beiden Trainingsinterventionen war es von Interesse, die Beziehung des miRNA-Akutmusters zu der insgesamt erzielten Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit zu untersuchen. Nach Abschluss des zwölfwöchigen Trainings wiesen beide Trainingsgruppen eine vergleichbare Steigerung der  $\dot{V}O_2\text{max}$ - und  $LTP_2$ -Werte auf, sodass gefolgert werden kann, dass die Abfolge der Trainingsmodalitäten keinen Einfluss auf die Gesamt-Trainingsantwort hat. Überraschenderweise zeigte sich trotz der vergleichbaren Fitnesszunahme der beiden Trainingsgruppen keine gemeinsame Beziehung zwischen dem miRNA-Akutmuster und der Veränderung der physiologischen Parameter, und auch bei der Analyse der Gesamtkohorte wurde keine Korrelation zwischen der akuten belastungsinduzierten Veränderung der miRNA-Expression und der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  bzw. der  $\Delta LTP_2$ , die nach Beendigung des zwölfwöchigen Trainingsprogramms gemessen wurde, beobachtet (s. Kapitel 3.3). In der HIIT-MICT-Trainingsgruppe zeigte sich eine Korrelation der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  T0/T2 sowohl mit der  $\Delta\text{miR-27a-3p}$  als auch mit der  $\Delta\text{miR-133a-3p}$  und der  $\Delta\text{miR-133a-5p}$ . Die  $\Delta LTP_2$  T0/T2 korrelierte in dieser Gruppe mit der  $\Delta\text{miR-1-3p}$ , der  $\Delta\text{miR-27a-3p}$  sowie mit der  $\Delta\text{miR-497-5p}$ . In der MICT-HIIT-Trainingsgruppe zeigte sich hingegen eine Korrelation zwischen der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  T0/T2 und der  $\Delta\text{miR-199a-5p}$  sowie der  $\Delta\text{miR-497-5p}$  und die  $\Delta LTP_2$  T0/T2 korrelierte in dieser Gruppe mit der  $\Delta\text{miR-18a-5p}$  sowie mit der  $\Delta\text{miR-133b}$  (s. Kapitel 3.3). Auf Grund der negativen Korrelation sowohl mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  T0/T2 als auch mit der  $\Delta LTP_2$  T0/T2 in der HIIT-MICT-Trainingsgruppe könnte insbesondere miR-27a-3p ein nützliches Instrument bei der Planung individueller Trainingspläne darstellen. Die Beziehung zwischen der miR-27a-3p-Expression und beiden ausdauerbasierten Parametern verstärkt die Hypothese, dass die Veränderung dieser miRNA tatsächlich mit den trainingsinduzierten Anpassungsreaktionen der Skelettmuskulatur in Beziehung stehen könnte. Angesichts der Differenzen

zwischen den beiden Trainingsgruppen und der fehlenden Korrelationen bei der Analyse der gesamten Kohorte wäre es jedoch auch möglich, dass es sich bei den detektierten Zusammenhängen zwischen miRNA-Akutmustern und Determinanten der Fitnesssteigerung auch um zufällig entstandene Korrelationen handelt, die auf die geringe Teilnehmerinnenzahl zurückzuführen sein könnten. Daher wäre es lohnend, diese miRNAs in einer größeren Kohorte zu analysieren, um zwischen tatsächlich vorhandenen Beziehungen und zufällig entstandenen Korrelationen zu unterscheiden.

Des Weiteren scheint der Trainingsstatus maßgeblich die molekulare Reaktion zu beeinflussen. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass - zumindest in der Theorie - Krafttraining, nicht aber aerobes Training, die muskuläre Proteinproduktion steigert und somit langfristig zu Muskelhypertrophie führt. Im Gegensatz dazu umfasst die Anpassung an aerobes Training primär die Steigerung der oxidativen Kapazität der Skelettmuskulatur (s. Kapitel 1.1.2). In untrainierten, nicht jedoch in trainierten Muskeln konnte paradoxerweise eine erhöhte Aktivität von PGC1 $\alpha$  und VEGF in Reaktion auf eine akute Kraftbelastung detektiert werden (Fernandez-Gonzalo et al., 2013; Wilkinson et al., 2008). Des Weiteren wurde in trainingsnaiven Muskeln in Reaktion auf eine akute aerobe Belastung eine erhöhte Phosphorylierung von AKT und mTOR gezeigt (Wilkinson et al., 2008). Nach einer zehnwöchigen Trainingsperiode fiel jedoch eine Modus-spezifischere zelluläre Reaktion auf: Nach einer akuten Kraftübung nahm die myofibrilläre Proteinsynthese, nicht jedoch die mitochondriale Proteinsynthese zu, und in gleicher Weise zeigte sich nach einer aeroben Ausdauerübung eine Zunahme der mitochondrialen, nicht aber der myofibrillären Proteinsynthese (Wilkinson et al., 2008). Diese Beobachtungen legen nahe, dass auch die miRNA-Antwort in Reaktion auf eine akute Belastung in trainingsnaiven Muskeln unspezifisch initiiert werden könnte und dass chronisches Training die unspezifischen Reaktionen auf eine akute Belastung, die in untrainierten Muskeln zu beobachten sind, abschwächt (Fernandez-Gonzalo et al., 2013). Es gibt bereits Hinweise darauf, dass diese Unterschiede in der molekularen Akutantwort tatsächlich die adaptive Reaktion auf chronisches Training vorhersagen könnten. So korrelierte in vorherigen Studien eine erhöhte Phosphorylierung von p70S6K

mit der anschließenden Zunahme der Muskelmasse nach sechswöchiger elektrischer Stimulation bei Ratten (Baar & Esser, 1999) sowie nach 14-wöchigem Krafttraining bei Männern (Terzis et al., 2008). Daher könnte auch das miRNA-Akutmuster, auf Grund der Regulation der Genexpression und folglich Veränderung der Proteinaktivität, ein prognostischer Biomarker der Trainingsreaktion sein. Allerdings sind die bisherigen Daten in Bezug auf potenzielle Biomarker der Trainingsreaktion inkonsistent, was sich auch in der vorliegenden Arbeit in den Korrelationsanalysen nach Abschluss des zwölfwöchigen Trainings zeigte. Des Weiteren konnte in einer Studie von Mitchell et al. (2012), bei der drei verschiedene Krafttrainingsformen eingesetzt wurden, der Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsgrad von p70S6K und der Zunahme der Muskelmasse ebenfalls nicht bestätigt werden. Daher sind weitere Studien erforderlich, bevor einzelne molekulare Marker identifiziert werden können, um physiologische Langzeitergebnisse mit Sicherheit vorherzusagen. In der vorliegenden Arbeit wiesen die Probandinnen zudem vor Beginn der Trainingsintervention vergleichbare Fitnessniveaus auf, wodurch eine Analyse in Abhängigkeit des Trainingsstatus nicht möglich war. In zukünftigen Studien sollten daher größere Kohorten analysiert werden, die sich im Hinblick auf Geschlecht, Alter und insbesondere Trainingsstatus unterscheiden. Des Weiteren sollte das molekulare Profil in Zusammenhang mit verschiedenen Belastungs- und Trainingsmodalitäten untersucht werden und neben miRNAs weitere potenzielle molekulare Marker der Trainingsanpassung, wie beispielsweise das Genexpressionsprofil oder das Phosphorylierungsmuster verschiedener Proteine, in die Analyse miteingeschlossen werden.

#### **4.1.4 Limitationen der miRNA-Analyse**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, miRNAs als potenzielle Biomarker für die Vorhersage der individuellen Trainingsreaktion zu identifizieren. Jedoch ist die Gewinnung von Skelettmuskelbiopsien in der klinischen Routine und/oder in der wettkampforientierten Trainingssteuerung nicht praktikabel. Trainingsinduzierte Veränderungen des miRNA-Profiles lassen sich jedoch nicht nur im Skelettmuskelgewebe detektieren, sondern auch im Blutkreislauf. Die Gewinnung von Plasmaproben gestaltet sich hierbei im klinischen Alltag schnell

und unkompliziert. Einige Studien konnten bereits eine Veränderung des miRNA-Profiles in Reaktion auf eine akute oder chronische Belastung in humanen Plasmaproben sowie Beziehungen zwischen dem miRNA-Profil im Blutkreislauf und physiologischen Parametern, einschließlich der  $\dot{V}O_2\text{max}$ , nachweisen (Baggish et al., 2011; Bye et al., 2013; Li et al., 2018). Daher könnte die belastungs-/trainingsinduzierte Veränderung der Muster zirkulierender miRNAs einen praktikablen Marker für die individuelle Trainingsreaktion darstellen. Die zirkulierenden miRNAs werden jedoch von den verschiedensten Organen und Zelltypen in den Blutkreislauf freigesetzt, wodurch das Expressionsmuster von einer Reihe physiologischer und/oder pathologischer Stimuli bestimmt wird. Hieraus resultiert eine Vielzahl an Variablen, die das individuelle miRNA-Profil beeinflussen, was die Evaluation von miRNA-Spezies als geeignete Biomarker erschwert. Die Analyse eines bestimmten Gewebetyps, wie der Skelettmuskulatur, ermöglicht im Gegensatz hierzu die Charakterisierung des miRNA-Profiles unter stabileren Bedingungen und führt zudem zu einem fundierteren Verständnis der adaptiven Prozesse des Skelettmuskels in Reaktion auf Training.

Wie bereits erwähnt, ermöglicht das Studienprotokoll der vorliegenden Arbeit keine funktionellen Untersuchungen. Daher können nur hypothetische Überlegungen, basierend auf Literaturdaten und katalogisierten Datenbanken über potenzielle miRNA-Gen-Interaktionen, getroffen werden. In zukünftigen Studien sollten daher funktionelle Experimente mittels *knockout*-Mäusen durchgeführt werden oder das Genexpressionsprofil und die Proteinmenge in Abhängigkeit der miRNA-Expression simultan gemessen werden.

Des Weiteren handelt es sich bei der vorliegenden Studie um eine Pilotstudie. Ziel war es, einen generalisierten Einblick in die Veränderung des miRNA-Profiles bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur zu erhalten. Auf Grund der geringen Probandinnenanzahl ( $n = 29$ ) erlaubt es dieser explorative Ansatz nicht, komplexe statistische Verfahren anzuwenden, also solche, die über einfache Korrelationsanalysen hinausgehen. Der Schwerpunkt lag auf der Charakterisierung möglicher Beziehungen zwischen miRNA-Expressionsmustern und durch Training erzielten physiologischen Effekten, wobei keine a



*priori* formulierten Hypothesen bestätigt werden sollten, sondern neue Ansätze für bestätigende Analysen erzeugt werden sollten. Diese müssen nun formuliert und anhand einer größeren Anzahl von Testpersonen und verschiedenen Kohorten, die sich in Bezug auf Alter, Geschlecht, Grundaktivitätsniveau, Gesundheitszustand und insbesondere bezüglich der von ihnen durchgeführten Trainingsprogramme unterscheiden, überprüft werden. Auf Grund des explorativen Charakters dieser Studie wurde daher auf eine Korrektur der Signifikanzniveaus wegen mehrfach Anwendung statistischer Tests (wie beispielsweise Bonferroni-Korrektur für multiples Testen) verzichtet. Darüber hinaus ist zu beachten, dass keine Korrektur von Ausreißern vorgenommen wurde. Dies ist insbesondere bei der Interpretation der Korrelationsanalysen relevant. Auf Grund der geringen Anzahl an Teilnehmerinnen ist es möglich, dass sich ein potenzieller Ausreißer, definiert als Beobachtungswert, der mehr als den 1,5fachen Interquartilabstand vom ersten oder dritten Quartil entfernt liegt, bei der Analyse eines größeren Kollektivs innerhalb des Interquartilabstands befindet. Daher wurden Ausreißer nicht aus der Analyse ausgeschlossen.

## **4.2 Diskussion methodischer Aspekte**

### **4.2.1 Bewertung der Mikroarray-Technik als Screening-Tool**

Mikroarrays ermöglichen eine umfassende und unvoreingenommene Untersuchung der zu analysierenden Proben auf alle zu diesem Zeitpunkt bekannten miRNAs. Hierbei ist keine Vorselektion der zu untersuchenden Spezies nötig, wodurch diese Technologie ein attraktives Instrument in hypothesengenerierenden Studien darstellt. Allerdings ist die Durchführung aufwändig und teuer, wodurch die zu analysierende Probenanzahl limitiert wird (Wheelan et al., 2008). Daher müssen die Ergebnisse meist durch ergänzende Techniken in einer größeren Kohorte verifiziert werden. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit das LNA-miRNA-qPCR-System von Qiagen (Hilden, Deutschland) als Validierungstechnik eingesetzt.

Beim Vergleich der Mikroarray-Daten mit den qPCR-Daten zeigte sich in den Expressionsprofilen der sechs Probandinnen eine gute Gesamtkonkordanz von 73,33 % (s. Kapitel 3.2.4). Differierende Werte zeigten sich für miR-18a-5p,

miR-19b-3p, miR-133a-5p und miR-155-5p. Bei der Analyse des Gesamtkollektivs (n = 29) wiesen hingegen alle analysierten miRNAs im Mittel dieselbe Tendenz in Bezug auf ihre Regulation (Induktion oder Repression) auf, wie die, die in der Mikroarray-Analyse (n = 6) detektiert wurde (s. Kapitel 3.2.4). Die qPCR-Daten von miR-23a-5p, miR-4330, miR-4743-5p sowie miR-7151-3p konnten allerdings auf Grund der Anhäufung unspezifischer Signale nicht zuverlässig ausgewertet werden (s. Kapitel 3.2.5).

In dieser Arbeit wurde ein Oligonukleotid-Mikroarray (Thermo Fisher Scientific/Affymetrix, Waltham, MA, USA), der auch als „*short*“-Oligonukleotid-Mikroarray bezeichnet wird, angewandt. Eine Problematik in der Anwendung eines Mikroarrays als *Screening*-Untersuchung besteht in den unterschiedlichen Normalisierungsstrategien der Mikroarray- und der qPCR-Technik. In *short*-Oligonukleotid-Mikroarrays werden Nukleinsäureketten mit einer Länge von 25 – 30 Basenpaare auf der Mikroarray-Oberfläche synthetisiert, sogenannte Nukleinsäuresonden (Lockhart et al., 1996). Da eine Kreuzhybridisierung des spezifischen Transkripts mit anderen cDNA-Sequenzen nicht auszuschließen ist, werden je Basensequenz zwei identische Sonden aufgetragen, die sich lediglich in einer einzelnen zentralen Base unterscheiden. Hieraus resultiert eine mit dem zu analysierenden Transkript perfekt übereinstimmende Basensequenz und eine nicht-perfekt übereinstimmende Sonde, die unspezifische Hybridisierungen messen soll (Lipshutz et al., 1999; Taib, 2004). Die Differenz der Fluoreszenzsignale dieser Bindungen dient somit der Normalisierung von unspezifischen Hintergrundsignalen und spezifischen Hybridisierungseffekten (Jiang et al., 2008; Tarca et al., 2006). Des Weiteren werden häufig exogene RNA-Transkripte (*spike-ins*) verwendet, welche den zu analysierenden Proben in bekannter Konzentration beigemischt werden und die an Kontrollsonden binden. Auf diese Weise können systematische Messfehler beseitigt werden, nicht jedoch intrinsische Störvariablen, die beispielsweise die Probengewinnung und -lagerung oder die RNA-Isolierung betreffen (Calza et al., 2008). Die Normalisierung der Ct-Werte in der qPCR-Untersuchung in der vorliegenden Arbeit basierte hingegen auf der Verwendung von endogenen Referenz-miRNAs, die den Vorteil bieten, dass sie denselben exogenen als auch endogenen

Einflussfaktoren wie das zu untersuchende Transkript unterliegen. Die Bestimmung geeigneter Referenz-miRNAs wurde mit Hilfe des Algorithmus RefFinder (Xie et al., 2012) durchgeführt. Jedoch kann bereits die Wahl alternativer Referenz-miRNAs hierbei zu unterschiedlichen Ergebnissen und somit unterschiedlichen Interpretationen führen (Faraldi et al., 2019). Da die verwendete Normalisierungsstrategie die analytische Bewertung in hohem Maße beeinflusst (Faraldi et al., 2019), können hierdurch auch differierende Ergebnisse zwischen der Mikroarray- und der qPCR-Analytik erklärt werden.

Darüber hinaus werden die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse von jedem Schritt des experimentellen Verfahrens beeinflusst, von der Array-Herstellung über die Probenvorbereitung bis hin zur endgültigen Fluoreszenzsignalanalyse (Kothapalli et al., 2002). Die Mikroarray-Analyse in der vorliegenden Arbeit wurde in einem externen Labor durchgeführt (ATLAS Biolabs, Berlin, Deutschland), woraus sich zahlreiche nicht beeinflussbare Variationsquellen ergeben, beginnend mit dem Transport der isolierten RNA an ATLAS Biolabs (Berlin, Deutschland). Durch falsche Lagerung während dieses Prozesses, beispielsweise verursacht durch Kippen der Versandbox und dadurch reduzierten Kontakt der Proben mit dem Trockeneis, könnten Degradationsprozesse befördert werden. Des Weiteren steht die Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben in engem Zusammenhang mit der Effizienz der reversen Transkription, bei der die Qualität verschiedener Reagenzien, insbesondere der Enzyme, das Reaktionsergebnis beeinflussen können. Mängel bei der Durchführung der reversen Transkription können beispielsweise auf die Verschleppung kontaminierender Faktoren, wie Partikel in der Luft, Salze, Phenol oder Alkohole, zurückzuführen sein (Freeman et al., 1999). Durch die resultierende beeinträchtigte Qualität der RNA können die Ergebnisse beeinflusst werden. Daher könnte die Kongruenz zwischen den Mikroarray- und den qPCR-Ergebnissen erhöht werden, indem die Mikroarray- und qPCR-Analyse im selben Labor durchgeführt werden würde, um auf diese Weise Unregelmäßigkeiten in der Versuchsdurchführung zu minimieren.

Mikroarrays ermöglichen es, die Proben auf mehrere tausend Transkripte gleichzeitig zu untersuchen. Dies führt jedoch zu der Problematik, eine adäquate

Strategie zu entwickeln, Gene bzw. miRNAs für die weiterführende Analyse zu selektieren. Die Definition differenziell exprimierter miRNAs wurde in der vorliegenden Studie anhand der *Fold change* getroffen und die folgenden Korrelationsanalysen bezogen nur diejenigen miRNAs mit ein, die bei der Akutantwort der Skelettmuskulatur eine *Fold change* mit dem Faktor  $\geq 4,5$  aufwiesen (s. Kapitel 3.1.2). Dieses Auswahlkriterium führt jedoch zur präferentiellen Selektion niedrig exprimierter miRNAs, die im Vergleich zu miRNAs mit höherer Expression einen größeren inhärenten Fehler in ihren Messwerten aufweisen, so dass häufiger fälschlicherweise eine hohe *Fold change* gemessen wird. Daher kann diese Strategie zu einer Unterrepräsentation von miRNAs führen, die in hohem Maße exprimiert werden (Claverie, 1999; Mutch et al., 2002). Dies führt zudem bei der nachfolgenden qPCR-Analyse zu der Komplikation, dass sich hier die Detektion sehr niedrig konzentrierter Nukleinsäuren problematisch gestaltet, da mit steigenden PCR-Zyklen zunehmend unspezifische Produkte gebildet werden (Freeman et al., 1999; Liu & Saint, 2002). Dieser Sachverhalt kann durch den Einsatz von LNA-Oligonukleotid-*Primern* reduziert werden, die eine höhere Amplifikationseffizienz im Vergleich zu DNA-PCR-*Primern* aufweisen. Dies wird im folgenden Kapitel (4.2.2) weiterführend erläutert.

#### **4.2.2 Bewertung der LNA-qPCR-Technik als Validierungsinstrument**

Die Entwicklung der LNAs verbesserte erheblich den spezifischen und empfindlichen Nachweis von kleinen, nichtkodierenden RNAs, wie beispielsweise miRNAs (Koshkin, Rajwanshi, et al., 1998; Obika et al., 1998). In LNA-Nukleotiden ist das Sauerstoffatom am C-2' der Ribose über eine Methylenbrücke mit dem 4'-Kohlenstoffatom verbunden (s. Kapitel 2.4.8.2, Abbildung 11). Die resultierende 3'-Endo-Konformation der Base weist eine eingeschränkte Konformationsfreiheit auf, wodurch die Bindungsaffinität der komplementären Basensequenzen und/oder die Affinität der Taq-DNA-Polymerase für die *Primer* erhöht wird (Koshkin, Singh, et al., 1998; Obika et al., 1998). Die erhöhte Spezifität der LNA-*Primer* konnte unter verschiedensten PCR-Konditionen und in multiplen Reaktionen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine erhöhte maximale *Annealing*-Temperatur, wodurch die Spezifität der *Primer*-

Hybridisierung an die komplementären Nukleinsäuresequenzen und die Effizienz der Amplifikation erhöht wird und folglich der Ct-Wert signifikant gesenkt werden kann (Levin et al., 2006; Malgoyre et al., 2007). Daher ermöglicht die LNA-qPCR-Technik auch die Detektion sehr niedrig konzentrierter Transkripte (Malgoyre et al., 2007). Darüber hinaus weisen die LNA-Oligonukleotide eine erhöhte thermische Stabilität auf, wodurch die Schmelztemperatur erhöht wird und die Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten in der Schmelzkurvenanalyse (s. Kapitel 2.4.8.1, Abbildung 10) verbessert wird (Braasch & Corey, 2001; K. Singh et al., 1998; Koshkin, Singh, et al., 1998; Wang et al., 1999).

Ein weiterer Vorteil ist, dass durch Einbau von LNA-Nukleotiden kürzere Oligonukleotid-*Primer* bei gleichbleibender Schmelztemperatur synthetisiert werden können. Durch die kürzeren Oligonukleotidstränge wird die Detektion kurzer und sehr ähnlicher Zielsequenzen ermöglicht (Latorra et al., 2003). Darüber hinaus ist die Amplifikation von GC-reichen Nukleinsäuresequenzen mittels qPCR ein seit langem bekanntes Problem, da die komplementären *Primer* zur Bildung von *Primer*-Dimeren und Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen (Kumar & Kaur, 2014; Mamedov et al., 2008). Durch gezielte LNA-Substitution kann jedoch der Zielbereich der optimalen Schmelztemperatur ausgeweitet werden und ermöglicht so die robuste Detektion aller (miRNA-)Sequenzen unabhängig vom GC-Gehalt der Probe (Latorra et al., 2003; Levin et al., 2006).

Jedoch konnten trotz dieser verbesserten Konditionen im Rahmen dieser Arbeit vier miRNAs auf Grund der Anhäufung unspezifischer Fluoreszenzsignale nicht zuverlässig quantifiziert werden. Von diesen stellen miR-4330, miR-4743-5p sowie miR-7151-3p neuere miRNA-Spezies dar, während miR-23a-5p als der „nicht dominante“ Strang der miR-23a-Spezies angesehen wird. Daher wurden diese vier miRNAs bis heute wenig erforscht, wodurch die Anwendung der zu diesen miRNA-Sequenzen komplementären LNA-*Primer* in vorherigen Studien begrenzt ist. Da die Position der LNA-Oligonukleotide jedoch in hohem Maße die thermodynamischen Parameter bestimmt und die Auswirkung der LNAs auf die Stabilität der hybridisierten Duplex stark sequenzabhängig zu sein scheint (Levin et al., 2006; McTigue et al., 2004), könnte eine Anpassung der *Primer*-

Eigenschaften für die zuverlässige Detektion dieser miRNA-Sequenzen an die verschiedenen PCR-Konditionen angezeigt sein.

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass die miRNA-Mikroarray-Analyse einer kleinen Untergruppe von Proben ein effizientes Vorauswahlinstrument darstellen könnte, um trainingsinduzierte miRNA-Muster im Skelettmuskelgewebe zu charakterisieren. Die LNA-qPCR-Technik ist zudem eine hochgradig spezifische und empfindliche Nachweismethode für miRNAs und ermöglicht es auch, zwischen Sequenzen, die sich lediglich in einem Basenpaar unterscheiden, zu diskriminieren (Simeonov & Nikiforov, 2002). Daher stellt diese Technik ein hoch sensitives und robustes Validierungsinstrument dar. Durch die hohe Affinität der LNA-*Primer* für die komplementären Sequenzen bzw. die Taq-DNA-Polymerase (Koshkin, Singh, et al., 1998; Obika et al., 1998) können niedrigere *Primer*- oder Polymerase-Konzentrationen eingesetzt werden, wodurch die Kosten gesenkt werden können (Latorra et al., 2003). Limitiert wird der Einsatz der LNA-*Primer* jedoch bei der Analyse wenig erforschter miRNA-Sequenzen und die Anwendung herkömmlicher DNA-*Primer* könnte in diesen Experimenten gegebenenfalls eine zuverlässigere Detektion ermöglichen.

#### **4.2.3 Bewertung der $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ und der $\Delta LTP_2$ als Marker der aeroben Ausdauerleistung**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung der miRNA-Expression als prognostischer Parameter für die Vorhersage der individuellen Trainingsreaktion untersucht werden. Einige Aspekte sprechen dafür, die  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  als primären physiologischen Marker der ausdauerbasierten Trainingsadaptation zu betrachten. Die Messung der  $\dot{V}O_2\text{max}$  ist seit mehr als einem halben Jahrhundert verfügbar und liefert aussagekräftige Informationen über die maximale kardiorespiratorische Fitness einer Person, da sie maßgeblich vom kardialen Schlagvolumen und somit vom Herzzeitvolumen abhängig ist (Bassett, 2000; Hellsten & Nyberg, 2015). Daher ist die  $\dot{V}O_2\text{max}$  der Parameter, der in wissenschaftlichen Studien am häufigsten zur Messung der Ausdauerleistungsfähigkeit herangezogen wird. Die Erhebung und Interpretation der  $\dot{V}O_2\text{max}$  birgt jedoch einige Schwierigkeiten: Bereits während des

Belastungstests wird die Höhe der  $\dot{V}O_2\text{max}$  von den Fähigkeiten und dem Verhalten des Messpersonals sowie der Motivation und Anstrengung der Testperson maßgeblich beeinflusst (Edvardsen et al., 2014). Vor allem untrainierte Personen brechen die Belastung auf Grund der Ermüdung peripherer Körperteile oder aufgrund von orthopädischen Problemen vermehrt frühzeitig ab, bevor die maximale Sauerstoffaufnahmekapazität ausgeschöpft ist. Um gültige und zuverlässige Ergebnisse zu generieren sowie die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Erhebungen zu gewährleisten, wurde eine Vielzahl an Kriterien etabliert, die das tatsächliche Erreichen der  $\dot{V}O_2\text{max}$  charakterisieren sollen. Das von Taylor et al. (1955) beschriebene klassische Plateau der Sauerstoffaufnahme gilt als Goldstandard für die Bestimmung der tatsächlichen  $\dot{V}O_2\text{max}$ . Dieses Kriterium ist jedoch in der Praxis nicht einfach zu handhaben, da u. a. nicht jede Person ein klar abzugrenzendes Plateau zeigt (Ferguson, 2014; Smirmaul et al., 2013). Deshalb wurde eine Vielzahl weiterer Endkriterien in die klinische Praxis aufgenommen, wie zum Beispiel eine erhöhte RER  $\geq 1,0$  (Aspenes et al., 2011; Davis et al., 2002; Paterson et al., 1999),  $\geq 1,10$  (Brown et al., 2002; Nelson et al., 2010) oder  $\geq 1,15$  (B. Issekutz et al., 1962; Howley et al., 1995), das Erreichen eines bestimmten Prozentsatzes der altersabhängigen Schätzung der  $HF_{\text{max}}$  (Brown et al., 2002; Jackson et al., 2009), eine maximale Blutlaktatkonzentration von  $\geq 8$  mmol/l (Astrand et al., 1973; Howley et al., 1995), die Bewertung der empfundenen Anstrengung durch die Testperson (Borg-Skala oder visuelle Analogskala) (Church et al., 2008) oder eine Kombination der oben genannten Variablen, wie in dieser Arbeit angewandt (s. Kapitel 2.4.1) (Edvardsen et al., 2013). Daher gibt es derzeit keinen gemeinsamen Konsens für die Bewertung der maximal erreichbaren Ausdauerleistung und das Wissen über die Validität der  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Werte, die basierend auf unterschiedlichen Endkriterien erhoben wurden, ist gering (Edvardsen et al., 2014; Smirmaul et al., 2013). Die Interpretation der  $\dot{V}O_2\text{max}$  wird darüber hinaus dadurch erschwert, dass sowohl exogene als auch endogene Faktoren Einfluss auf die Höhe der  $\dot{V}O_2\text{max}$  nehmen. So wurde beispielsweise eine negative Korrelation zwischen dem BMI sowie der Höhe des Körperfettanteils und der  $\dot{V}O_2\text{max}$  publiziert (Mondal & Mishra, 2017; Shete et al., 2014). Daher wird häufig die  $\dot{V}O_2\text{max}$  auf den fettfreien

Körperanteil anstatt auf das gesamte Körpergewicht bezogen (Tompuri et al., 2015). Die in dieser Arbeit untersuchten Teilnehmerinnen wiesen allerdings ausnahmslos Normalgewicht mit einem durchschnittlichen BMI von  $23,5 \pm 2,57 \text{ kg/m}^2$  auf, weshalb auf eine Normalisierung auf die fettfreie Körpermasse verzichtet wurde und die relative  $\dot{V}O_2\text{max}$  auf das gesamte Körpergewicht bezogen wurde. Ein weiterer Nachteil der  $\dot{V}O_2\text{max}$  als Trainingsparameter ist, dass die Trainierbarkeit der  $\dot{V}O_2\text{max}$  eine Heritabilität von ca. 50 % aufweist, d. h. zu einem gewissen Prozentsatz genetisch determiniert ist (Bouchard et al., 1999). Frauen weisen zudem eine 10 – 20 % niedrigere  $\dot{V}O_2\text{max}$  als Männer auf (Sharma & Kailashiya, 2016; Sparling, 1980), selbst wenn die Variabilität der aeroben Kapazität aufgrund der Körpergröße und des Körperfettanteils herausgerechnet wird (Sharma & Kailashiya, 2016). Trotz dieser Limitationen ist die Bestimmung der  $\dot{V}O_2\text{max}$  eine der gängigsten Methoden in der Sportwissenschaft und Sportmedizin, um die kardiorespiratorische Fitness einer Person zu bestimmen, und wurde als internationaler Standard für die Messung der aeroben Kapazität festgelegt (Shete et al., 2014). Daher wurde die  $\dot{V}O_2\text{max}$  in dieser Arbeit als primärer Marker der trainingsinduzierten Verbesserung der aeroben Ausdauerleistung verwendet und die Korrelation dieses Parameters mit der Änderung der miRNA-Expression ins Zentrum der Analyse gestellt. Durch die beschriebenen Schwierigkeiten, die mit der  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Bestimmung assoziiert sind, müssen Vergleiche mit anderen wissenschaftlichen Studien jedoch kritisch betrachtet werden. Zudem existieren bisher wenige Studien, die die  $\dot{V}O_2\text{max}$  im Zusammenhang mit der trainingsinduzierten Veränderung zirkulierender oder muskulärer miRNAs analysierten (Aoi et al., 2013; Baggish et al., 2011; Bye et al., 2013; Li et al., 2018; Widmann et al., 2022), wobei bis *dato* keine der Autorin bekannte Studie publiziert wurde, die das miRNA-Akutmuster der Skelettmuskulatur in Bezug auf die trainingsinduzierte  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$  untersuchte. Daher liefert diese Arbeit einen neuen, innovativen Ansatz der Trainingssteuerung.

Neben der  $\dot{V}O_2\text{max}$  wurde die  $LTP_2$  als weiterer physiologischer Marker der Trainingsadaptation betrachtet. Die Blutlaktatkonzentration spiegelt die metabolische Ausbelastung des Organismus wider und die  $LTP_2$  charakterisiert



die maximale Leistungsintensität, die über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden kann (Berg, 1993). Die Beziehung zwischen der Blutlaktatkonzentration und der Leistungsfähigkeit wird im ansteigenden Stufentest durch schrittweise Erhöhung der Trainingsintensität und simultaner Laktatmessung bestimmt. Eine Rechtsverschiebung dieser Laktatkurve bzw. ein verzögerter Anstieg wird als höhere metabolische Leistungsfähigkeit interpretiert und umgekehrt (Roecker, 2020) (s. Kapitel 1.1.1, Abbildung 2). Daher wurde die  $LT_2$  als Maß für die aerobe Ausdauerfähigkeit beschrieben: Mit Hilfe der  $LT_2$  lässt sich die Ausdauerleistung sensitiv erfassen und sie bietet zudem den Vorteil, dass ihre Bestimmung im Gegensatz zur  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Messung unabhängig von der Motivation und finalen Ausbelastung der Testperson ist (Kindermann, 2004; Meyer et al., 1999). Schließlich kann die Laktatdiagnostik auch zur individuellen Trainingssteuerung herangezogen werden, da anhand der Laktatkonzentration die Trainingsintensität festgelegt werden kann. Dies ist zwar prinzipiell auch unter Anwendung prozentualer  $\dot{V}O_2\text{max}$ -Werte möglich, jedoch kann mit Hilfe der Laktatkurve der optimale metabolische Wirkungsbereich des Trainings noch genauer charakterisiert werden (Kindermann, 2004) (s. Kapitel 1.1.1). Die Laktatdiagnostik hat daher einen hohen Stellenwert in der klinischen und sportmedizinischen Leistungsdiagnostik und wurde aus diesem Grund in die Auswertung der vorliegenden Arbeit miteinbezogen. Jedoch ist die Definition der  $LT_2$  uneinheitlich und es existiert eine große Anzahl an Konzepten für die Ermittlung dieses Schwellenwerts (Roecker, 2020). Daraus ergibt sich die Problematik, dass die Grenzwerte, welche die  $LT_2$  definieren, sich je nach Konzept unterscheiden und die uneinheitliche Verwendung von Begrifflichkeiten zu Verwirrungen führen kann (Roecker, 2008). So bezeichnet beispielsweise die Laktatschwelle nach Mader (1976) ein maximales Laktat-*Steady-State* bei einer Laktatkonzentration von 4 mmol/l, in der Theorie von Keul (1979) liegt die  $LT_2$  bei dem Wert, an dem die Laktatkurve eine Tangentensteigung von 1,26 mmol/l aufweist, und die international gebräuchliche Definition von Wassermann (1973) bezeichnet jene Leistung, bei der die Blutlaktatkonzentration erstmals ansteigt als „*Anaerobic Threshold*“. Diese Schwelle wird wiederum in anderen Definitionen als aerobe Schwelle oder  $LT_1$  bezeichnet (Kindermann, 2004;

Roecker, 2008). Darüber hinaus sind die Konzepte zum Teil störanfällig sowie methodisch und rechnerisch aufwendig (Dickhuth, 1989), und die verschiedenen Messmethoden weisen teilweise eine niedrige Validität, Reliabilität und/oder Praktikabilität auf (Roecker, 2020).

Ein weiterer Aspekt, der sowohl bei der Laktat- als auch der  $\dot{V}O_2$ max-Analyse berücksichtigt werden muss, ist die technische und biologische Variabilität (Tschopp et al., 2001). So wurde bei beiden Messmethoden eine Test-Retest-Variabilität von 2 - 6 % detektiert (Heck, 1990; Katch et al., 1982; MacDougall, 1991; Pfitzinger & Freedson, 1998). Dies bedeutet, dass eine Erhöhung der  $\dot{V}O_2$ max um beispielsweise 3 % selbst unter standardisierten Bedingungen nicht als nachgewiesene Verbesserung der Ausdauer betrachtet werden kann (Tschopp et al., 2001). Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich jedoch um eine explorative, hypothesengenerierende Studie. Die detektierten Zusammenhänge müssen nun in größeren Kohorten verifiziert werden. Daher wurde keine Korrektur der Irrtumswahrscheinlichkeit auf Grund der Variabilität vorgenommen.

## 5 Zusammenfassung

Selbst unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen ist die Trainingsreaktion von verschiedenen Personen auch auf völlig standardisierte Trainingsprogramme bemerkenswert heterogen und die Prognose des Trainingsansprechens anhand von Kandidatengenese zeigt in bisherigen Studien nur einen begrenzten Vorhersagewert (Bouchard, 2012). Auf Grund der gesundheitsfördernden Wirkung von körperlichem Training auf kardiovaskuläre, metabolische und muskuläre Pathologien, ist die Identifizierung möglicher Ansätze, die individuelle Trainingsreaktion auf ein bestimmtes Trainingsprogramm zu prognostizieren, medizinisch in hohem Maße relevant.

Die vorliegende Studie soll dazu beitragen, sich diesem Ziel zu nähern. Sie zielt darauf ab, neue prognostische Marker zu ermitteln, indem sie spezifische miRNA-Spezies in der Skelettmuskulatur identifiziert, die gute Kandidaten für individualisierte Trainings-Biomarker sein könnten. Auf Grund der Funktion dieser kleinen, nichtkodierenden RNAs bei der Entwicklung, Plastizität und trainingsinduzierten Adaptation der Skelettmuskulatur liegt ihre potenzielle Eignung als Biomarker in diesem Kontext nahe. In der vorliegenden Arbeit wurde das miRNA-Profil der Skelettmuskulatur nach einer akuten moderat-intensiven Ausdauerbelastung analysiert und die Veränderung der miRNA-Expression mit der Veränderung der Ausdauerleistungsfähigkeit, insbesondere den individuellen Veränderungen der maximalen Sauerstoffaufnahme ( $\Delta\dot{V}O_{2\max}$ ) in Antwort auf ein mehrwöchiges hochintensives Intervall- (HIIT) oder moderat-intensives kontinuierliches Training (MICT), korreliert. Zunächst wurden die Skelettmuskelbiopsien von sechs weiblichen Testpersonen mittels Affymetrix-Mikroarray-Technik analysiert, da diese Technologie ein schnelles, umfassendes und unvoreingenommenes *Screening* auf nahezu alle bis *dato* bekannten miRNAs ermöglicht. Hierdurch wurden 2592 reife miRNA-Spezies identifiziert, von denen 55 eine differenzielle Expression um den Faktor  $\geq 4,5$ , welcher als Schwellenwert für die *Fold change* gesetzt wurde, zeigten. In nachfolgenden quantitativen Polymerase-Kettenreaktionen (qPCR) wurden die miRNAs miR-15a-5p, miR-18a-5p, miR-19b-3p, miR-132-3p, miR-155-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-497-5p, miR-4330, miR-4743-5p und miR-7151-3p in einer größeren

Kohorte von Studienteilnehmerinnen (n = 29) weiterführend analysiert, da diese miRNA-Spezies in der Mikroarray-Untersuchung eine starke Korrelation ( $r = \geq 0,7$  bzw.  $r = \leq -0,7$ ) mit der  $\Delta\dot{V}O_2\text{max}$ , die sich nach dem ersten sechswöchigen Trainingsblock zeigte, aufwiesen. Des Weiteren wurden die muskelspezifischen miRNAs miR-1-3p, miR-133a-3p/-5p, miR-133b und miR-499a-5p sowie die miRNA-Spezies miR-23a-5p, miR-27a-3p und miR-378a-5p auf Grund ihrer funktionellen Bedeutung in der trainingsinduzierten Anpassung der Skelettmuskulatur in die qPCR-Experimente eingeschlossen. In den Korrelationsanalysen konnte der Einfluss des miRNA-Akutmusters dann auf die physiologische Anpassung zweier unterschiedlicher Trainingsmodalitäten (HIIT vs. MICT) verglichen werden. Auf Grund der Korrelation mit der Veränderung der physiologischen Parameter nach Abschluss des ersten Trainingsblocks kristallisierten sich miR-199a-3p und miR-199a-5p als potenzielle Prädiktoren für das Trainingsansprechen auf ein hochintensives Ausdauertraining heraus, wohingegen miR-19b-3p ein interessanter Kandidat als Biomarker für die physiologische Trainingsreaktion auf ein moderat-intensives Training darstellt. Im Anschluss an den ersten sechswöchigen Trainingsblock führten die Teilnehmerinnen das entsprechend andere, vorher nicht absolvierte Trainingsprogramm (HIIT respektive MICT) für weitere sechs Wochen durch. Trotz vergleichbarer Fitnesszunahme beider Gruppen nach Beendigung des insgesamt zwölfwöchigen Trainings zeigten sich unterschiedliche Beziehungen zwischen der Veränderung der physiologischen Parameter und dem miRNA-Akutmuster. In zukünftigen Studien muss daher die Frage beantwortet werden, ob es sich bei diesen Korrelationen um tatsächlich vorhandene oder um zufällig entstandene Beziehungen, möglicherweise auf Grund der geringen Probandinnenanzahl, handelt. Hierfür sollte das miRNA-Akutmuster weiterführend in größeren Kohorten analysiert werden, die sich im Hinblick auf Geschlecht, Alter, Trainingsstatus und der durchgeführten Trainingsmodalitäten unterscheiden. Des Weiteren sollten neben miRNAs weitere potenzielle molekulare Marker der Trainingsanpassung, wie beispielsweise das Genexpressionsprofil oder das Phosphorylierungsmuster verschiedener Proteine, in die Analyse miteingeschlossen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achanta, G., Sasaki, R., Feng, L., Carew, J. S., Lu, W., Pelicano, H., Keating, M. J., & Huang, P. (2005). Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *Embo j*, 24(19), 3482-3492.
- Akimoto, T., Li, P., & Yan, Z. (2008). Functional interaction of regulatory factors with the Pgc-1alpha promoter in response to exercise by in vivo imaging. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(1), C288-292.
- Alexander, M. S., Casar, J. C., Motohashi, N., Myers, J. A., Eisenberg, I., Gonzalez, R. T., Estrella, E. A., Kang, P. B., Kawahara, G., & Kunkel, L. M. (2011). Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA. *Skelet Muscle*, 1, 27.
- Alexander, M. S., Casar, J. C., Motohashi, N., Vieira, N. M., Eisenberg, I., Marshall, J. L., Gasperini, M. J., Lek, A., Myers, J. A., Estrella, E. A., Kang, P. B., Shapiro, F., Rahimov, F., Kawahara, G., Widrick, J. J., & Kunkel, L. M. (2014). MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J Clin Invest*, 124(6), 2651-2667.
- Alexander, M. S., Kawahara, G., Motohashi, N., Casar, J. C., Eisenberg, I., Myers, J. A., Gasperini, M. J., Estrella, E. A., Kho, A. T., Mitsuhashi, S., Shapiro, F., Kang, P. B., & Kunkel, L. M. (2013). MicroRNA-199a is induced in dystrophic muscle and affects WNT signaling, cell proliferation, and myogenic differentiation. *Cell Death Differ*, 20(9), 1194-1208.
- Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J Biol Chem*, 280(20), 19445-19448.
- Ameling, S., Kacprowski, T., Chilukoti, R. K., Malsch, C., Liebscher, V., Suhre, K., Pietzner, M., Friedrich, N., Homuth, G., Hammer, E., & Völker, U. (2015). Associations of circulating plasma microRNAs with age, body mass index and sex in a population-based study. *BMC medical genomics*, 8, 61-61.
- Anand, S., Majeti, B. K., Acevedo, L. M., Murphy, E. A., Mukthavaram, R., Scheppke, L., Huang, M., Shields, D. J., Lindquist, J. N., Lapinski, P. E., King, P. D., Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2010). MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nature medicine*, 16(8), 909-914.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250.
- Andersen, P., & Saltin, B. (1985). Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *The Journal of Physiology*, 366, 233-249.

- Aoi, W., Ichikawa, H., Mune, K., Tanimura, Y., Mizushima, K., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2013). Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. *Front Physiol*, *4*, 80.
- Aspenes, S. T., Nilsen, T. I., Skaug, E. A., Bertheussen, G. F., Ellingsen, Ø., Vatten, L., & Wisløff, U. (2011). Peak oxygen uptake and cardiovascular risk factors in 4631 healthy women and men. *Med Sci Sports Exerc*, *43*(8), 1465-1473.
- Astrand, I., Astrand, P. O., Hallbäck, I., & Kilbom, A. (1973). Reduction in maximal oxygen uptake with age. *J Appl Physiol*, *35*(5), 649-654.
- Atherton, P. J., Babraj, J., Smith, K., Singh, J., Rennie, M. J., & Wackerhage, H. (2005). Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *Faseb j*, *19*(7), 786-788.
- B. Issekutz, J., Birkhead, N. C., & Rodahl, K. (1962). Use of respiratory quotients in assessment of aerobic work capacity. *Journal of Applied Physiology*, *17*(1), 47-50.
- Baar, K., & Esser, K. (1999). Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol*, *276*(1), C120-127.
- Baar, K., Wende, A. R., Jones, T. E., Marison, M., Nolte, L. A., Chen, M., Kelly, D. P., & Holloszy, J. O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb j*, *16*(14), 1879-1886.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J. R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J. R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., & Zorzano, A. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem*, *278*(19), 17190-17197.
- Backes, C., Fehlmann, T., Kern, F., Kehl, T., Lenhof, H. P., Meese, E., & Keller, A. (2018). miRCarta: a central repository for collecting miRNA candidates. *Nucleic Acids Res*, *46*(D1), D160-d167.
- Baggish, A. L., Hale, A., Weiner, R. B., Lewis, G. D., Systrom, D., Wang, F., Wang, T. J., & Chan, S. Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*, *589*(Pt 16), 3983-3994.
- Bamman, M. M., Shipp, J. R., Jiang, J., Gower, B. A., Hunter, G. R., Goodman, A., McLafferty, C. L., Jr., & Urban, R. J. (2001). Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *280*(3), E383-390.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215-233.
- Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2006). Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 19-37.

- Bassett, D. R. J. E. T. H. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 32(1).
- Beck, K. C., Randolph, L. N., Bailey, K. R., Wood, C. M., Snyder, E. M., & Johnson, B. D. (2006). Relationship between cardiac output and oxygen consumption during upright cycle exercise in healthy humans. *Journal of Applied Physiology*, 101(5), 1474-1480.
- Berg, A. (1993). Laktat-Leistungsdiagnostik (I): Laktat als fundierter Parameter in der Trainingssteuerung. Leistungssport, Breitensport und Reha-Bereich profitieren. *Therapiewoche / TW-Sport + Medizin*, 5(4), S. 280-283.
- Binder, R. K., Wonisch, M., Corra, U., Cohen-Solal, A., Vanhees, L., Saner, H., & Schmid, J. P. (2008). Methodological approach to the first and second lactate threshold in incremental cardiopulmonary exercise testing. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 15(6), 726-734.
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J., & Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11), 1014-1019.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, 10(2), 185-191.
- Bolster, D. R., Crozier, S. J., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem*, 277(27), 23977-23980.
- Bolster, D. R., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2003). Translational control mechanisms modulate skeletal muscle gene expression during hypertrophy. *Exerc Sport Sci Rev*, 31(3), 111-116.
- Boon, H., Sjögren, R. J., Massart, J., Egan, B., Kostovski, E., Iversen, P. O., Hjeltnes, N., Chibalin, A. V., Widegren, U., & Zierath, J. R. (2015). MicroRNA-208b progressively declines after spinal cord injury in humans and is inversely related to myostatin expression. *Physiol Rep*, 3(11).
- Bouchard, C. (2012). Genomic predictors of trainability. *Experimental Physiology*, 97(3), 347-352.
- Bouchard, C., An, P., Rice, T., Skinner, J. S., Wilmore, J. H., Gagnon, J., Pérusse, L., Leon, A. S., & Rao, D. C. (1999). Familial aggregation of VO<sub>2</sub>(max) response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. *J Appl Physiol* (1985), 87(3), 1003-1008.
- Braasch, D. A., & Corey, D. R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chemistry & Biology*, 8(1), 1-7.
- Brown, J. D., Mahon, A. D., & Plank, D. M. (2002). Attainment of maximal exercise criteria in boys and men. *J Sports Med Phys Fitness*, 42(2), 135-140.
- Browne, G. J., Finn, S. G., & Proud, C. G. (2004). Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor

- 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J Biol Chem*, 279(13), 12220-12231.
- Browne, G. J., & Proud, C. G. (2002). Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem*, 269(22), 5360-5368.
- Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 630-644.
- Bull, F. C., Al-Ansari, S. S., Biddle, S., Borodulin, K., Buman, M. P., Cardon, G., Carty, C., Chaput, J. P., Chastin, S., Chou, R., Dempsey, P. C., DiPietro, L., Ekelund, U., Firth, J., Friedenreich, C. M., Garcia, L., Gichu, M., Jago, R., Katzmarzyk, P. T., . . . Willumsen, J. F. (2020). World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br J Sports Med*, 54(24), 1451-1462.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 15(3), 155-166.
- Bye, A., Røsjø, H., Aspenes, S. T., Condorelli, G., Omland, T., & Wisløff, U. (2013). Circulating microRNAs and aerobic fitness--the HUNT-Study. *PLoS One*, 8(2), e57496.
- Calderon-Dominguez, M., Belmonte, T., Quezada-Feijoo, M., Ramos-Sánchez, M., Fernández-Armenta, J., Pérez-Navarro, A., Cesar, S., Peña-Peña, L., Vea, À., Llorente-Cortés, V., Mangas, A., de Gonzalo-Calvo, D., & Toro, R. (2020). Emerging role of microRNAs in dilated cardiomyopathy: evidence regarding etiology. *Transl Res*, 215, 86-101.
- Callis, T. E., Pandya, K., Seok, H. Y., Tang, R. H., Tatsuguchi, M., Huang, Z. P., Chen, J. F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M. S., Selzman, C. H., & Wang, D. Z. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*, 119(9), 2772-2786.
- Calza, S., Valentini, D., & Pawitan, Y. (2008). Normalization of oligonucleotide arrays based on the least-variant set of genes. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 140.
- Carrer, M., Liu, N., Grueter, C. E., Williams, A. H., Frisard, M. I., Hulver, M. W., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2012). Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378\*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(38), 15330-15335.
- Cartoni, R., Léger, B., Hock, M. B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., Ziltener, J. L., Luthi, F., Dériaz, O., Zorzano, A., Gobelet, C., Kralli, A., & Russell, A. P. (2005). Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol*, 567(Pt 1), 349-358.
- Chemello, F., Grespi, F., Zulian, A., Cancellara, P., Hebert-Chatelain, E., Martini, P., Bean, C., Alessio, E., Buson, L., Bazzega, M., Armani, A., Sandri, M., Ferrazza, R., Laveder, P., Guella, G., Reggiani, C., Romualdi, C., Bernardi, P., Scorrano, L., . . . Lanfranchi, G. (2019). Transcriptomic Analysis of Single Isolated Myofibers Identifies miR-27a-



- 3p and miR-142-3p as Regulators of Metabolism in Skeletal Muscle. *Cell Rep*, 26(13), 3784-3797.e3788.
- Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L., & Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 38(2), 228-233.
- Chen, R., Lei, S., Jiang, T., She, Y., & Shi, H. (2020). Regulation of Skeletal Muscle Atrophy in Cachexia by MicroRNAs and Long Non-coding RNAs. *Front Cell Dev Biol*, 8, 577010.
- Chen, X., Huang, Z., Chen, D., Yang, T., & Liu, G. (2013). MicroRNA-27a is induced by leucine and contributes to leucine-induced proliferation promotion in C2C12 cells. *Int J Mol Sci*, 14(7), 14076-14084.
- Chin, E. R. (2005). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol* (1985), 99(2), 414-423.
- Church, T. S., Gill, T. M., Newman, A. B., Blair, S. N., Earnest, C. P., & Pahor, M. (2008). Maximal fitness testing in sedentary elderly at substantial risk of disability: LIFE-P study experience. *J Aging Phys Act*, 16(4), 408-415.
- Claverie, J. M. (1999). Computational methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Hum Mol Genet*, 8(10), 1821-1832.
- Coffey, V. G., & Hawley, J. A. (2007). The molecular bases of training adaptation. *Sports Med*, 37(9), 737-763.
- Coffey, V. G., Shield, A., Canny, B. J., Carey, K. A., Cameron-Smith, D., & Hawley, J. A. (2006). Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290(5), E849-855.
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. L. Erlbaum Associates.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559), 785-789.
- Cui, S., Li, L., Mubarakah, S. N., & Meech, R. (2019). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling induces the myomiRs miR-133b and miR-206 to suppress Pax7 and induce the myogenic differentiation program. *J Cell Biochem*, 120(8), 12740-12751.
- Cui, S., Sun, B., Yin, X., Guo, X., Chao, D., Zhang, C., Zhang, C.-Y., Chen, X., & Ma, J. (2017). Time-course responses of circulating microRNAs to three resistance training protocols in healthy young men. *Scientific Reports*, 7(1), 2203.
- Czubryt, M. P., McAnally, J., Fishman, G. I., & Olson, E. N. (2003). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1711-1716.
- D'Souza, R. F., Markworth, J. F., Aasen, K. M. M., Zeng, N., Cameron-Smith, D., & Mitchell, C. J. (2017). Acute resistance exercise modulates microRNA expression profiles: Combined tissue and circulatory targeted analyses. *PLoS One*, 12(7), e0181594.

- Davidson, P. K., Gallagher, I. J., Hartman, J. W., Tarnopolsky, M. A., Dela, F., Helge, J. W., Timmons, J. A., & Phillips, S. M. (2011). High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. *J Appl Physiol* (1985), 110(2), 309-317.
- Davis, J. A., Storer, T. W., Caiozzo, V. J., & Pham, P. H. (2002). Lower reference limit for maximal oxygen uptake in men and women. *Clin Physiol Funct Imaging*, 22(5), 332-338.
- De Angelis, L., Borghi, S., Melchionna, R., Berghella, L., Baccarani-Contri, M., Parise, F., Ferrari, S., & Cossu, G. (1998). Inhibition of myogenesis by transforming growth factor beta is density-dependent and related to the translocation of transcription factor MEF2 to the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12358-12363.
- Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., & White, B. A. (1993). Polymerase Chain Reaction. In B. A. White (Ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (pp. 1-29). Humana Press.
- DeRan, M., Yang, J., Shen, C. H., Peters, E. C., Fitamant, J., Chan, P., Hsieh, M., Zhu, S., Asara, J. M., Zheng, B., Bardeesy, N., Liu, J., & Wu, X. (2014). Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomin-1 protein. *Cell Rep*, 9(2), 495-503.
- Dey, B. K., Gagan, J., & Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 Induce Myoblast Differentiation by Downregulating Pax7. *Molecular and Cellular Biology*, 31(1), 203-214.
- Dickhuth, H. H. (1989). Möglichkeiten und Grenzen der Leistungsdiagnostik und Trainingssteuerung im Mittel- und Langstreckenlauf. *Leistungssport*, 19(4), S. 21-24.
- Doghman, M., El Wakil, A., Cardinaud, B., Thomas, E., Wang, J., Zhao, W., Peralta-Del Valle, M. H., Figueiredo, B. C., Zambetti, G. P., & Lalli, E. (2010). Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*, 70(11), 4666-4675.
- Drake, J. C., Wilson, R. J., & Yan, Z. (2016). Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *Faseb j*, 30(1), 13-22.
- Dreyer, H. C., Fujita, S., Cadenas, J. G., Chinkes, D. L., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2006). Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol*, 576(Pt 2), 613-624.
- Drummond, M. J., Glynn, E. L., Fry, C. S., Dhanani, S., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2009). Essential Amino Acids Increase MicroRNA-499, -208b, and -23a and Downregulate Myostatin and Myocyte Enhancer Factor 2C mRNA Expression in Human Skeletal Muscle. *The Journal of Nutrition*, 139(12), 2279-2284.
- Drummond, M. J., McCarthy, J. J., Fry, C. S., Esser, K. A., & Rasmussen, B. B. (2008). Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(6), E1333-1340.

- Edvardsen, E., Hansen, B. H., Holme, I. M., Dyrstad, S. M., & Anderssen, S. A. (2013). Reference values for cardiorespiratory response and fitness on the treadmill in a 20- to 85-year-old population. *Chest*, *144*(1), 241-248.
- Edvardsen, E., Hem, E., & Anderssen, S. A. (2014). End criteria for reaching maximal oxygen uptake must be strict and adjusted to sex and age: a cross-sectional study. *PLoS One*, *9*(1), e85276-e85276.
- Egan, B., Dowling, P., O'Connor, P. L., Henry, M., Meleady, P., Zierath, J. R., & O'Gorman, D. J. (2011). 2-D DIGE analysis of the mitochondrial proteome from human skeletal muscle reveals time course-dependent remodelling in response to 14 consecutive days of endurance exercise training. *Proteomics*, *11*(8), 1413-1428.
- Egan, B., O'Connor, P. L., Zierath, J. R., & O'Gorman, D. J. (2013). Time course analysis reveals gene-specific transcript and protein kinetics of adaptation to short-term aerobic exercise training in human skeletal muscle. *PLoS One*, *8*(9), e74098.
- Egan, B., & Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, *17*(2), 162-184.
- Eichner, L. J., Perry, M.-C., Dufour, C. R., Bertos, N., Park, M., St-Pierre, J., & Giguère, V. (2010). miR-378\* Mediates Metabolic Shift in Breast Cancer Cells via the PGC-1 $\beta$ /ERR $\gamma$  Transcriptional Pathway. *Cell Metabolism*, *12*(4), 352-361.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A. A., Lidov, H. G., Kang, P. B., North, K. N., Mitrani-Rosenbaum, S., Flanigan, K. M., Neely, L. A., Whitney, D., Beggs, A. H., Kohane, I. S., & Kunkel, L. M. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(43), 17016-17021.
- Elia, L., Contu, R., Quintavalle, M., Varrone, F., Chimenti, C., Russo, M. A., Cimino, V., De Marinis, L., Frustaci, A., Catalucci, D., & Condorelli, G. (2009). Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation*, *120*(23), 2377-2385.
- Faraldi, M., Gomasasca, M., Sansoni, V., Perego, S., Banfi, G., & Lombardi, G. (2019). Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. *Sci Rep*, *9*(1), 1584.
- Fashakin, J. B., Awoyefa, M. B., & Fürst, P. (1986). The application of protein concentrates from locally available legumes in the development of weaning foods. *Z Ernährungswiss*, *25*(4), 220-227.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, *39*(2), 175-191.
- Ferguson, B. (2014). ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription 9th Ed. 2014. *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*, *58*(3), 328-328.
- Fernandes, T., Magalhães, F. C., Roque, F. R., Phillips, M. I., & Oliveira, E. M. (2012). Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension*, *59*(2), 513-520.

- Fernandez-Gonzalo, R., Lundberg, T. R., & Tesch, P. A. (2013). Acute molecular responses in untrained and trained muscle subjected to aerobic and resistance exercise training versus resistance training alone. *Acta Physiologica*, *209*(4), 283-294.
- Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R. F., Wythe, J. D., Ivey, K. N., Bruneau, B. G., Stainier, D. Y., & Srivastava, D. (2008). miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*, *15*(2), 272-284.
- Flück, M., & Hoppeler, H. (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, *146*, 159-216.
- Fochi, S., Giuriato, G., De Simone, T., Gomez-Lira, M., Tamburin, S., Del Piccolo, L., Schena, F., Venturelli, M., & Romanelli, M. G. (2020). Regulation of microRNAs in Satellite Cell Renewal, Muscle Function, Sarcopenia and the Role of Exercise. *International journal of molecular sciences*, *21*(18), 6732.
- Fornari, F., Milazzo, M., Chieco, P., Negrini, M., Calin, G. A., Grazi, G. L., Pollutri, D., Croce, C. M., Bolondi, L., & Gramantieri, L. (2010). MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res*, *70*(12), 5184-5193.
- Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques*, *26*(1), 112-125.
- Freitas, F. C. P., Depintor, T. S., Agostini, L. T., Luna-Lucena, D., Nunes, F. M. F., Bitondi, M. M. G., Simões, Z. L. P., & Lourenço, A. P. (2019). Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in three stingless bee species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Scientific Reports*, *9*(1), 17692.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, *19*(1), 92-105.
- Gabriel, B. M., Hamilton, D. L., Tremblay, A. M., & Wackerhage, H. (2016). The Hippo signal transduction network for exercise physiologists. *J Appl Physiol (1985)*, *120*(10), 1105-1117.
- Gagan, J., Dey, B. K., Layer, R., Yan, Z., & Dutta, A. (2011). MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. *J Biol Chem*, *286*(22), 19431-19438.
- Gan, Z., Rumsey, J., Hazen, B. C., Lai, L., Leone, T. C., Vega, R. B., Xie, H., Conley, K. E., Auwerx, J., Smith, S. R., Olson, E. N., Kralli, A., & Kelly, D. P. (2013). Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. *J Clin Invest*, *123*(6), 2564-2575.
- Gavin, T. P., Ruster, R. S., Carrithers, J. A., Zwetsloot, K. A., Kraus, R. M., Evans, C. A., Knapp, D. J., Drew, J. L., McCartney, J. S., Garry, J. P., & Hickner, R. C. (2007). No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *J Physiol*, *585*(Pt 1), 231-239.
- Geng, T., Li, P., Okutsu, M., Yin, X., Kwek, J., Zhang, M., & Yan, Z. (2010). PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial

- biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(3), C572-579.
- Gerin, I., Bommer, G. T., McCain, C. S., Sousa, K. M., Krishnan, V., & MacDougald, O. A. (2010). Roles for miRNA-378/378\* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(2), E198-206.
- Ghosh, H. S., McBurney, M., & Robbins, P. D. (2010). SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One*, 5(2), e9199.
- Giagnorio, E., Malacarne, C., Mantegazza, R., Bonanno, S., & Marcuzzo, S. (2021). MyomiRs and their multifaceted regulatory roles in muscle homeostasis and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Cell Science*, 134(12).
- Goedecke, J. H., St Clair Gibson, A., Grobler, L., Collins, M., Noakes, T. D., & Lambert, E. V. (2000). Determinants of the variability in respiratory exchange ratio at rest and during exercise in trained athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(6), E1325-1334.
- Goljanek-Whysall, K., Sweetman, D., Abu-Elmagd, M., Chapnik, E., Dalmay, T., Hornstein, E., & Münsterberg, A. (2011). MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29), 11936-11941.
- Gollnick, P. D., & Saltin, B. (1982). Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clinical Physiology*, 2(1), 1-12.
- Gomes, C. P., Oliveira, G. P., Jr., Madrid, B., Almeida, J. A., Franco, O. L., & Pereira, R. W. (2014). Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. *Biomarkers*, 19(7), 585-589.
- Gonçalves, T. J. M., Boutillon, F., Lefebvre, S., Goffin, V., Iwatsubo, T., Wakabayashi, T., Oury, F., & Armand, A. S. (2019). Collagen XXV promotes myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle formation. *Sci Rep*, 9(1), 5878.
- Goodman, C. A., Dietz, J. M., Jacobs, B. L., McNally, R. M., You, J. S., & Hornberger, T. A. (2015). Yes-Associated Protein is up-regulated by mechanical overload and is sufficient to induce skeletal muscle hypertrophy. *FEBS Lett*, 589(13), 1491-1497.
- Govindarajan, R., Duraiyan, J., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Microarray and its applications. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(Suppl 2), S310-S312.
- Greco, S., De Simone, M., Colussi, C., Zaccagnini, G., Fasanaro, P., Pescatori, M., Cardani, R., Perbellini, R., Isaia, E., Sale, P., Meola, G., Capogrossi, M. C., Gaetano, C., & Martelli, F. (2009). Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *The FASEB Journal*, 23(10), 3335-3346.
- Green, D. J., Spence, A., Rowley, N., Thijssen, D. H. J., & Naylor, L. H. (2012). Vascular adaptation in athletes: is there an 'athlete's artery'? *Experimental Physiology*, 97(3), 295-304.

- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, *432*(7014), 235-240.
- Gu, Q., Wang, B., Zhang, X. F., Ma, Y. P., Liu, J. D., & Wang, X. Z. (2014). Contribution of renin-angiotensin system to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol*, *23*(5), 298-305.
- Güller, I., & Russell, A. P. (2010). MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol*, *588*(Pt 21), 4075-4087.
- Guo, L., Liang, T., Yu, J., & Zou, Q. (2016). A Comprehensive Analysis of miRNA/isomiR Expression with Gender Difference. *PLoS One*, *11*(5), e0154955.
- Guo, L., Zhang, H., Zhao, Y., Yang, S., & Chen, F. (2014). Selected isomiR expression profiles via arm switching? *Gene*, *533*(1), 149-155.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, *30*(2), 214-226.
- Hamada, K., Vannier, E., Satchek, J. M., Witsell, A. L., & Roubenoff, R. (2005). Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. *Faseb j*, *19*(2), 264-266.
- Hamrick, M. W., Herberg, S., Arounleut, P., He, H. Z., Shiver, A., Qi, R. Q., Zhou, L., Isales, C. M., & Mi, Q. S. (2010). The adipokine leptin increases skeletal muscle mass and significantly alters skeletal muscle miRNA expression profile in aged mice. *Biochem Biophys Res Commun*, *400*(3), 379-383.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T., & Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, *125*(5), 887-901.
- Hargreaves, M., & Spriet, L. L. (2020). Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism*, *2*(9), 817-828.
- Hawkins, S. F. C., & Guest, P. C. (2017). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. In P. C. Guest (Ed.), *Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications* (pp. 125-133). Springer New York.
- Hawley, J. A. (2002). Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *29*(3), 218-222.
- Hawley, J. A. (2009). Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? *Appl Physiol Nutr Metab*, *34*(3), 355-361.
- Hayashi, T., Hirshman, M. F., Fujii, N., Habinowski, S. A., Witters, L. A., & Goodyear, L. J. (2000). Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes*, *49*(4), 527-531.
- Heck, H. (1990). *Laktat in der Leistungsdiagnostik* (Vol. 22). Schorndorf: Hofmann.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, *6*(10), 986-994.

- Hellsten, Y., & Nyberg, M. (2015). Cardiovascular Adaptations to Exercise Training. *Compr Physiol*, 6(1), 1-32.
- Hellsten, Y., Nyberg, M., Jensen, L. G., & Mortensen, S. P. (2012). Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *The Journal of Physiology*, 590(24), 6297-6305.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology*, 11(9), 1026-1030.
- Hitachi, K., & Tsuchida, K. (2013). Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front Physiol*, 4, 408.
- Hofmann, P., Pokan, R., Von Duvillard, S. P., Seibert, F. J., Zweiker, R., & Schmid, P. (1997). Heart rate performance curve during incremental cycle ergometer exercise in healthy young male subjects. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 29(6).
- Hofmann, P., & Tschakert, G. (2017). Intensity- and Duration-Based Options to Regulate Endurance Training. *Front Physiol*, 8, 337.
- Hoier, B., & Hellsten, Y. (2014). Exercise-Induced Capillary Growth in Human Skeletal Muscle and the Dynamics of VEGF. *Microcirculation*, 21(4), 301-314.
- Holloszy, J. O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 242(9), 2278-2282.
- Holloszy, J. O., Oscai, L. B., Don, I. J., & Molé, P. A. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 40(6), 1368-1373.
- Horowitz, J. F. (2003). Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(8), 386-392.
- Hou, T., Ou, J., Zhao, X., Huang, X., Huang, Y., & Zhang, Y. (2014). MicroRNA-196a promotes cervical cancer proliferation through the regulation of FOXO1 and p27Kip1. *Br J Cancer*, 110(5), 1260-1268.
- Howley, E. T., Bassett, D. R., Jr., & Welch, H. G. (1995). Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Med Sci Sports Exerc*, 27(9), 1292-1301.
- Hu, W., Wang, T., Yue, E., Zheng, S., & Xu, J. H. (2014). Flexible microRNA arm selection in rice. *Biochem Biophys Res Commun*, 447(3), 526-530.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., & Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(16), 7455-7460.
- Hu, Z., Klein, J. D., Mitch, W. E., Zhang, L., Martinez, I., & Wang, X. H. (2014). MicroRNA-29 induces cellular senescence in aging muscle through multiple signaling pathways. *Aging (Albany NY)*, 6(3), 160-175.
- Huang, M. B., Xu, H., Xie, S. J., Zhou, H., & Qu, L. H. (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. *PLoS One*, 6(12), e29173.
- Huang, Z., Chen, X., Yu, B., He, J., & Chen, D. (2012). MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 423(2), 265-269.

- Hymer, W. C., Kraemer, W. J., Nindl, B. C., Marx, J. O., Benson, D. E., Welsch, J. R., Mazzetti, S. A., Volek, J. S., & Deaver, D. R. (2001). Characteristics of circulating growth hormone in women after acute heavy resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *281*(4), E878-887.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, *4*(9), 648-657.
- Ishido, M., Kami, K., & Masuhara, M. (2004). Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. *Acta Physiol Scand*, *180*(3), 281-289.
- Jackson, A. S., Sui, X., Hébert, J. R., Church, T. S., & Blair, S. N. (2009). Role of lifestyle and aging on the longitudinal change in cardiorespiratory fitness. *Arch Intern Med*, *169*(19), 1781-1787.
- Jia, H., Zhao, Y., Li, T., Zhang, Y., & Zhu, D. (2017). miR-30e is negatively regulated by myostatin in skeletal muscle and is functionally related to fiber-type composition. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *49*(5), 392-399.
- Jia, L., Li, Y.-F., Wu, G.-F., Song, Z.-Y., Lu, H.-Z., Song, C.-C., Zhang, Q.-L., Zhu, J.-Y., Yang, G.-S., & Shi, X.-E. (2013). MiRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway. *International journal of molecular sciences*, *15*(1), 296-308.
- Jiang, N., Leach, L. J., Hu, X., Potokina, E., Jia, T., Druka, A., Waugh, R., Kearsey, M. J., & Luo, Z. W. (2008). Methods for evaluating gene expression from Affymetrix microarray datasets. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 284.
- Jin, C.-l., Ye, J.-l., Yang, J., Gao, C.-q., Yan, H.-c., Li, H.-c., & Wang, X.-q. (2019). mTORC1 Mediates Lysine-Induced Satellite Cell Activation to Promote Skeletal Muscle Growth. *Cells*, *8*(12), 1549.
- Jin, Y., Tymen, S. D., Chen, D., Fang, Z. J., Zhao, Y., Dragas, D., Dai, Y., Marucha, P. T., & Zhou, X. (2013). MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing. *PLoS One*, *8*(5), e64434.
- Jones, S. W., Hill, R. J., Krasney, P. A., O'Conner, B., Peirce, N., & Greenhaff, P. L. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb j*, *18*(9), 1025-1027.
- Joris, V., Gomez, E. L., Menchi, L., Lobysheva, I., Di Mauro, V., Esfahani, H., Condorelli, G., Balligand, J. L., Catalucci, D., & Dessy, C. (2018). MicroRNA-199a-3p and MicroRNA-199a-5p Take Part to a Redundant Network of Regulation of the NOS (NO Synthase)/NO Pathway in the Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *38*(10), 2345-2357.
- Judson, R. N., Tremblay, A. M., Knopp, P., White, R. B., Urcia, R., De Bari, C., Zammit, P. S., Camargo, F. D., & Wackerhage, H. (2012). The Hippo pathway member Yap plays a key role in influencing fate decisions in muscle satellite cells. *J Cell Sci*, *125*(Pt 24), 6009-6019.



- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D. H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, *20*(7), 1992-2003.
- Jużwik, C. A., S. Drake, S., Zhang, Y., Paradis-Isler, N., Sylvester, A., Amar-Zifkin, A., Douglas, C., Morquette, B., Moore, C. S., & Fournier, A. E. (2019). microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Progress in Neurobiology*, *182*, 101664.
- K. Singh, S., A. Koshkin, A., Wengel, J., & Nielsen, P. (1998). LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition [10.1039/A708608C]. *Chemical Communications*(4), 455-456.
- Kadi, F., Johansson, F., Johansson, R., Sjöström, M., & Henriksson, J. (2004). Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochem Cell Biol*, *121*(4), 329-334.
- Kang, T., Lu, W., Xu, W., Anderson, L., Bacanamwo, M., Thompson, W., Chen, Y. E., & Liu, D. (2013). MicroRNA-27 (miR-27) targets prohibitin and impairs adipocyte differentiation and mitochondrial function in human adipose-derived stem cells. *The Journal of biological chemistry*, *288*(48), 34394-34402.
- Katch, V. L., Sady, S. S., & Freedson, P. (1982). Biological variability in maximum aerobic power. *Med Sci Sports Exerc*, *14*(1), 21-25.
- Keller, P., Vollaard, N. B., Gustafsson, T., Gallagher, I. J., Sundberg, C. J., Rankinen, T., Britton, S. L., Bouchard, C., Koch, L. G., & Timmons, J. A. (2011). A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *J Appl Physiol* (1985), *110*(1), 46-59.
- Keul, J. (1979). *Bestimmung der individuellen anaeroben Schwelle zur Leistungsbewertung und Trainingsgestaltung* (Vol. 30).
- Kiens, B., & Richter, E. A. (1998). Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *275*(2), E332-E337.
- Kindermann, W. (2004). Anaerobe Schwelle. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, *55*(6), S. 161-162.
- Kirby, T. J., & McCarthy, J. J. (2013). MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radic Biol Med*, *64*, 95-105.
- Köhler, M., Leitsch, D., Müller, N., & Walochnik, J. (2020). Validation of reference genes for the normalization of RT-qPCR gene expression in *Acanthamoeba* spp. *Scientific Reports*, *10*(1), 10362.
- Kong, D., He, M., Yang, L., Zhou, R., Yan, Y.-Q., Liang, Y., & Teng, C.-B. (2019). MiR-17 and miR-19 cooperatively promote skeletal muscle cell differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76*(24), 5041-5054.
- Koshkin, A. A., Rajwanshi, V. K., & Wengel, J. (1998). Novel convenient syntheses of LNA [2.2.1]bicyclo nucleosides. *Tetrahedron Letters*, *39*(24), 4381-4384.
- Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., & Wengel, J. (1998). LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, *54*(14), 3607-3630.

- Kothapalli, R., Yoder, S. J., Mane, S., & Loughran, T. P. (2002). Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics*, *3*(1), 22.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2018). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D155-D162.
- Kraemer, W. J., Marchitelli, L., Gordon, S. E., Harman, E., Dziados, J. E., Mello, R., Frykman, P., McCurry, D., & Fleck, S. J. (1990). Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. *J Appl Physiol* (1985), *69*(4), 1442-1450.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., & Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, *37*(5), 495-500.
- Kruskal, W. H., & Goodman, L. (1954). Measures of association for cross classifications. *Journal of the American Statistical Association*, *49*(268), 732-764.
- Kukreti, H., Amuthavalli, K., Harikumar, A., Sathiyamoorthy, S., Feng, P. Z., Anantharaj, R., Tan, S. L., Lokireddy, S., Bonala, S., Sriram, S., McFarlane, C., Kambadur, R., & Sharma, M. (2013). Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *J Biol Chem*, *288*(9), 6663-6678.
- Kumar, A., & Kaur, J. (2014). Primer Based Approach for PCR Amplification of High GC Content Gene: Mycobacterium Gene as a Model. *Molecular biology international*, *2014*, 937308-937308.
- Kumar, V., Selby, A., Rankin, D., Patel, R., Atherton, P., Hildebrandt, W., Williams, J., Smith, K., Seynnes, O., Hiscock, N., & Rennie, M. J. (2009). Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *The Journal of Physiology*, *587*(1), 211-217.
- Latorra, D., Arar, K., & Michael Hurley, J. (2003). Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Molecular and Cellular Probes*, *17*(5), 253-259.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo j*, *23*(20), 4051-4060.
- Lerman, G., Avivi, C., Mardoukh, C., Barzilai, A., Tessone, A., Gradus, B., Pavlotsky, F., Barshack, I., Polak-Charcon, S., Orenstein, A., Hornstein, E., Sidi, Y., & Avni, D. (2011). MiRNA expression in psoriatic skin: reciprocal regulation of hsa-miR-99a and IGF-1R. *PLoS One*, *6*(6), e20916.
- Levin, J. D., Fiala, D., Samala, M. F., Kahn, J. D., & Peterson, R. J. (2006). Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Research*, *34*(20), e142-e142.
- Li, P., Akimoto, T., Zhang, M., Williams, R. S., & Yan, Z. (2006). Resident stem cells are not required for exercise-induced fiber-type switching and angiogenesis but are necessary for activity-dependent muscle growth. *Am J Physiol Cell Physiol*, *290*(6), C1461-1468.

- Li, Y., Luan, Y., Li, J., Song, H., Li, Y., Qi, H., Sun, B., Zhang, P., Wu, X., Liu, X., Yang, Y., Tao, W., Cai, L., Yang, Z., & Yang, Y. (2020). Exosomal miR-199a-5p promotes hepatic lipid accumulation by modulating MST1 expression and fatty acid metabolism. *Hepatology International*, *14*(6), 1057-1074.
- Li, Y., Yao, M., Zhou, Q., Cheng, Y., Che, L., Xu, J., Xiao, J., Shen, Z., & Bei, Y. (2018). Dynamic Regulation of Circulating microRNAs During Acute Exercise and Long-Term Exercise Training in Basketball Athletes [Original Research]. *Frontiers in Physiology*, *9*.
- Liang, N., Zhang, C., Dill, P., Panasyuk, G., Pion, D., Koka, V., Gallazzini, M., Olson, E. N., Lam, H., Henske, E. P., Dong, Z., Apte, U., Pallet, N., Johnson, R. L., Terzi, F., Kwiatkowski, D. J., Scoazec, J. Y., Martignoni, G., & Pende, M. (2014). Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *J Exp Med*, *211*(11), 2249-2263.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R., & Spiegelman, B. M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, *418*(6899), 797-801.
- Lin, R. J., Lin, Y. C., & Yu, A. L. (2010). miR-149\* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Mol Carcinog*, *49*(8), 719-727.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R., & Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, *21*(1), 20-24.
- Liu, C., Chen, M., Wang, M., Pi, W., Li, N., & Meng, Q. (2018). MiR-18a regulates myoblasts proliferation by targeting Fgf1. *PLoS One*, *13*(7), e0201551-e0201551.
- Liu, D., Black, B. L., & Derynck, R. (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev*, *15*(22), 2950-2966.
- Liu, D., Kang, J. S., & Derynck, R. (2004). TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *Embo j*, *23*(7), 1557-1566.
- Liu, W., & Saint, D. A. (2002). A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics. *Analytical Biochemistry*, *302*(1), 52-59.
- Liu, Y., Randall, W. R., & Schneider, M. F. (2005). Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J Cell Biol*, *168*(6), 887-897.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Norton, H., & Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, *14*(13), 1675-1680.

- Lortie, G., Simoneau, J. A., Hamel, P., Boulay, M. R., Landry, F., & Bouchard, C. (1984). Responses of maximal aerobic power and capacity to aerobic training. *Int J Sports Med*, 5(5), 232-236.
- Lu, J., Webb, R., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (1999). MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(2), 552-557.
- MacDougall, J. D. W. H. A. G. H. J. C. A. o. S. S. (1991). *Physiological testing of the high-performance athlete*. Human Kinetics Books.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292-1305.
- Macrae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., & Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, 311(5758), 195-198.
- Mader, A. (1976). Zur Beurteilung der sportartspezifischen Ausdauerleistungsfähigkeit im Labor [Gedruckte Ressource]. *Sportarzt und Sportmedizin*, 27(4), S. 80-88, 85, S. 109-110, 112, 104 Darst.
- Mah, N., Thelin, A., Lu, T., Nikolaus, S., Kühbacher, T., Gurbuz, Y., Eickhoff, H., Klöppel, G., Lehrach, H., Mellgård, B., Costello, C. M., & Schreiber, S. (2004). A comparison of oligonucleotide and cDNA-based microarray systems. *Physiological Genomics*, 16(3), 361-370.
- Malgoyre, A., Banzet, S., Mouret, C., Bigard, A. X., & Peinnequin, A. (2007). Quantification of low-expressed mRNA using 5' LNA-containing real-time PCR primers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(1), 246-252.
- Mamedov, T. G., Pienaar, E., Whitney, S. E., TerMaat, J. R., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A., & Viljoen, H. J. (2008). A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational biology and chemistry*, 32(6), 452-457.
- Marco, A., Hui, J. H., Ronshaugen, M., & Griffiths-Jones, S. (2010). Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome Biol Evol*, 2, 686-696.
- Margolis, L. M., Berryman, C. E., Murphy, N. E., Carrigan, C. T., Young, A. J., Carbone, J. W., & Pasiakos, S. M. (2018). PI3K-AKT-FOXO1 pathway targeted by skeletal muscle microRNA to suppress proteolytic gene expression in response to carbohydrate intake during aerobic exercise. *Physiological Reports*, 6(23), e13931.
- Margolis, L. M., McClung, H. L., Murphy, N. E., Carrigan, C. T., & Pasiakos, S. M. (2017). Skeletal Muscle myomiR Are Differentially Expressed by Endurance Exercise Mode and Combined Essential Amino Acid and Carbohydrate Supplementation. *Front Physiol*, 8, 182.
- Martin, W. H., 3rd, Montgomery, J., Snell, P. G., Corbett, J. R., Sokolov, J. J., Buckey, J. C., Maloney, D. A., & Blomqvist, C. G. (1987). Cardiovascular adaptations to intense swim training in sedentary middle-aged men and women. *Circulation*, 75(2), 323-330.
- Masi, L. N., Serdan, T. D., Levada-Pires, A. C., Hatanaka, E., Silveira, L. D., Cury-Boaventura, M. F., Pithon-Curi, T. C., Curi, R., Gorjão, R., & Hirabara, S. M. (2016). Regulation of Gene Expression by Exercise-Related Micrnas. *Cell Physiol Biochem*, 39(6), 2381-2397.

- Massart, J., Sjögren, R. J. O., Egan, B., Garde, C., Lindgren, M., Gu, W., Ferreira, D. M. S., Katayama, M., Ruas, J. L., Barrès, R., O’Gorman, D. J., Zierath, J. R., & Krook, A. (2021). Endurance exercise training-responsive miR-19b-3p improves skeletal muscle glucose metabolism. *Nature Communications*, *12*(1), 5948.
- Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F., & Hwang, P. M. (2006). p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science*, *312*(5780), 1650-1653.
- Maturana, F. M., Schellhorn, P., Erz, G., Burgstahler, C., Widmann, M., Munz, B., Soares, R. N., Murias, J. M., Thiel, A., & Nieß, A. M. (2021). Individual cardiovascular responsiveness to work-matched exercise within the moderate- and severe-intensity domains. *European journal of applied physiology*, *121*(7), 2039-2059.
- McCarthy, J. J. (2008). MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta*, *1779*(11), 682-691.
- McCarthy, J. J., & Esser, K. A. (2007). MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985), *102*(1), 306-313.
- McCoy, C. E., Sheedy, F. J., Qualls, J. E., Doyle, S. L., Quinn, S. R., Murray, P. J., & O’Neill, L. A. J. (2010). IL-10 Inhibits miR-155 Induction by Toll-like Receptors\*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(27), 20492-20498.
- McGivney, B. A., Griffin, M. E., Gough, K. F., McGivney, C. L., Browne, J. A., Hill, E. W., & Katz, L. M. (2017). Evaluation of microRNA expression in plasma and skeletal muscle of thoroughbred racehorses in training. *BMC Vet Res*, *13*(1), 347.
- McLean, C. S., Mielke, C., Cordova, J. M., Langlais, P. R., Bowen, B., Miranda, D., Coletta, D. K., & Mandarino, L. J. (2015). Gene and MicroRNA Expression Responses to Exercise; Relationship with Insulin Sensitivity. *PLoS One*, *10*(5), e0127089.
- McTigue, P. M., Peterson, R. J., & Kahn, J. D. (2004). Sequence-dependent thermodynamic parameters for locked nucleic acid (LNA)-DNA duplex formation. *Biochemistry*, *43*(18), 5388-5405.
- Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *WIREs RNA*, *12*(3), e1627.
- Mendez, R., Kollmorgen, G., White, M. F., & Rhoads, R. E. (1997). Requirement of protein kinase C zeta for stimulation of protein synthesis by insulin. *Mol Cell Biol*, *17*(9), 5184-5192.
- Meyer, S. U., Thirion, C., Poleskaya, A., Bauersachs, S., Kaiser, S., Krause, S., & Pfaffl, M. W. (2015). TNF- $\alpha$  and IGF1 modify the microRNA signature in skeletal muscle cell differentiation. *Cell Communication and Signaling*, *13*(1), 4.
- Meyer, T., Gabriel, H. H., & Kindermann, W. (1999). Is determination of exercise intensities as percentages of VO<sub>2</sub>max or HRmax adequate? *Med Sci Sports Exerc*, *31*(9), 1342-1345.
- Michael, L. F., Wu, Z., Cheatham, R. B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J. J., Kelly, D. P., & Spiegelman, B. M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells

- by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7), 3820-3825.
- Mishima, T., Takizawa, T., Luo, S. S., Ishibashi, O., Kawahigashi, Y., Mizuguchi, Y., Ishikawa, T., Mori, M., Kanda, T., Goto, T., & Takizawa, T. (2008). MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. *Reproduction*, 136(6), 811-822.
- Mitchell, C. J., Churchward-Venne, T. A., West, D. W. D., Burd, N. A., Breen, L., Baker, S. K., & Phillips, S. M. (2012). Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 113(1), 71-77.
- Mo, J. S., Meng, Z., Kim, Y. C., Park, H. W., Hansen, C. G., Kim, S., Lim, D. S., & Guan, K. L. (2015). Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat Cell Biol*, 17(4), 500-510.
- Moberg, M., Lindholm, M. E., Reitzner, S. M., Ekblom, B., Sundberg, C. J., & Psilander, N. (2020). Exercise Induces Different Molecular Responses in Trained and Untrained Human Muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 52(8), 1679-1690.
- Mondal, H., & Mishra, S. P. (2017). Effect of BMI, Body Fat Percentage and Fat Free Mass on Maximal Oxygen Consumption in Healthy Young Adults. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 11(6), CC17-CC20.
- Morton, R. H., Fukuba, Y., Banister, E. W., Walsh, M. L., Kenny, C. T., & Cameron, B. J. (1994). Statistical evidence consistent with two lactate turnpoints during ramp exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 69(5), 445-449.
- Motohashi, N., Alexander, M. S., Shimizu-Motohashi, Y., Myers, J. A., Kawahara, G., & Kunkel, L. M. (2013). Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. *J Cell Sci*, 126(Pt 12), 2678-2691.
- Mueller, M., Breil, F. A., Lurman, G., Klossner, S., Flück, M., Billeter, R., Däpp, C., & Hoppeler, H. (2011). Different molecular and structural adaptations with eccentric and conventional strength training in elderly men and women. *Gerontology*, 57(6), 528-538.
- Mutch, D. M., Berger, A., Mansourian, R., Rytz, A., & Roberts, M.-A. (2002). The limit fold change model: A practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics*, 3(1), 17.
- Nachtomy, O., Shavit, A., & Yakhini, Z. (2007). Gene expression and the concept of the phenotype. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 38(1), 238-254.
- Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Polesskaya, A., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Soudi, M., Cuvellier, S., & Harel-Bellan, A. (2006). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*, 8(3), 278-284.
- Nakashima, K., & Yakabe, Y. (2007). AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases

- by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71(7), 1650-1656.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231-250.
- Nelson, M. D., Petersen, S. R., & Dlin, R. A. (2010). Effects of age and counseling on the cardiorespiratory response to graded exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 42(2), 255-264.
- Nelson, M. T., Biltz, G. R., & Dengel, D. R. (2015). Repeatability of Respiratory Exchange Ratio Time Series Analysis. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 29(9), 2550-2558.
- Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Akerström, T., Nielsen, A. R., Pedersen, B. K., & Laye, M. J. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*, 588(Pt 20), 4029-4037.
- Nindl, B. C. (2007). Exercise modulation of growth hormone isoforms: current knowledge and future directions for the exercise endocrinologist. *Br J Sports Med*, 41(6), 346-348; discussion 348.
- Nindl, B. C., Kraemer, W. J., Marx, J. O., Tuckow, A. P., & Hymer, W. C. (2003). Growth hormone molecular heterogeneity and exercise. *Exerc Sport Sci Rev*, 31(4), 161-166.
- Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J.-i., Morio, K.-i., Doi, T., & Imanishi, T. (1998). Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methyleneribonucleosides. *Tetrahedron Letters*, 39(30), 5401-5404.
- Ogasawara, R., Akimoto, T., Umeno, T., Sawada, S., Hamaoka, T., & Fujita, S. (2016). MicroRNA expression profiling in skeletal muscle reveals different regulatory patterns in high and low responders to resistance training. *Physiol Genomics*, 48(4), 320-324.
- Ohanna, M., Sobering, A. K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P. A., Sotiropoulos, A., & Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*, 7(3), 286-294.
- Onodera, Y., Teramura, T., Takehara, T., Itokazu, M., Mori, T., & Fukuda, K. (2018). Inflammation-associated miR-155 activates differentiation of muscular satellite cells. *PLoS One*, 13(10), e0204860.
- Paraskevopoulou, M. D., Vlachos, I. S., & Hatzigeorgiou, A. G. (2016). DIANA-TarBase and DIANA Suite Tools: Studying Experimentally Supported microRNA Targets. *Current Protocols in Bioinformatics*, 55(1), 12.14.11-12.14.18.
- Park, J. Y., Wang, P. Y., Matsumoto, T., Sung, H. J., Ma, W., Choi, J. W., Anderson, S. A., Leary, S. C., Balaban, R. S., Kang, J. G., & Hwang, P. M. (2009). p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ Res*, 105(7), 705-712, 711 p following 712.
- Paterson, D. H., Cunningham, D. A., Koval, J. J., & St Croix, C. M. (1999). Aerobic fitness in a population of independently living men and women aged 55-86 years. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 31(12), 1813-1820.

- Peake, J., Nosaka, K., & Suzuki, K. (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev*, *11*, 64-85.
- Pendergast, D. R., Leddy, J. J., & Venkatraman, J. T. (2000). A perspective on fat intake in athletes. *J Am Coll Nutr*, *19*(3), 345-350.
- Perry, C. G., Lally, J., Holloway, G. P., Heigenhauser, G. J., Bonen, A., & Spriet, L. L. (2010). Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol*, *588*(Pt 23), 4795-4810.
- Petrella, J. K., Kim, J. S., Cross, J. M., Kosek, D. J., & Bamman, M. M. (2006). Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *291*(5), E937-946.
- Pette, D., & Heilmann, C. (1977). Transformation of morphological, functional and metabolic properties of fast-twitch muscle as induced by long-term electrical stimulation. *Basic Res Cardiol*, *72*(2-3), 247-253.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, *1*, 89-113.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, *26*(6), 509-515.
- Pfitzinger, P., & Freedson, P. S. (1998). The reliability of lactate measurements during exercise. *Int J Sports Med*, *19*(5), 349-357.
- Pham, T. T., Ban, J., Lee, K., Hong, Y., Lee, J., Truong, A. D., Lillehoj, H. S., & Hong, Y. H. (2020). MicroRNA gga-miR-10a-mediated transcriptional regulation of the immune genes in necrotic enteritis afflicted chickens. *Dev Comp Immunol*, *102*, 103472.
- Phillips, S. M., Green, H. J., Tarnopolsky, M. A., Heigenhauser, G. J., & Grant, S. M. (1996). Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. *Am J Physiol*, *270*(2 Pt 1), E265-272.
- Philp, A., Chen, A., Lan, D., Meyer, G. A., Murphy, A. N., Knapp, A. E., Olfert, I. M., McCurdy, C. E., Marcotte, G. R., Hogan, M. C., Baar, K., & Schenk, S. (2011). Sirtuin 1 (SIRT1) deacetylase activity is not required for mitochondrial biogenesis or peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation following endurance exercise. *J Biol Chem*, *286*(35), 30561-30570.
- Philp, A., & Schenk, S. (2013). Unraveling the complexities of SIRT1-mediated mitochondrial regulation in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, *41*(3), 174-181.
- Poole, D. C., Rossiter, H. B., Brooks, G. A., & Gladden, L. B. (2021). The anaerobic threshold: 50+ years of controversy. *The Journal of Physiology*, *599*(3), 737-767.
- Prud'homme, D., Bouchard, C., Leblanc, C., Landry, F., & Fontaine, E. (1984). Sensitivity of maximal aerobic power to training is genotype-dependent. *Med Sci Sports Exerc*, *16*(5), 489-493.



- Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk , Kolmogorov-Smirnov , Lilliefors and Anderson-Darling tests.
- Rennie, M. J., Wackerhage, H., Spangenburg, E. E., & Booth, F. W. (2004). Control of the size of the human muscle mass. *Annu Rev Physiol*, *66*, 799-828.
- Riedmaier, I. (2011). Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. *BIOspektrum*, *17*, 295-297.
- Ringholm, S., Biensø, R. S., Kiilerich, K., Guadalupe-Grau, A., Aachmann-Andersen, N. J., Saltin, B., Plomgaard, P., Lundby, C., Wojtaszewski, J. F., Calbet, J. A., & Pilegaard, H. (2011). Bed rest reduces metabolic protein content and abolishes exercise-induced mRNA responses in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *301*(4), E649-658.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, *245*(2), 154-160.
- Rivas, D. A., Lessard, S. J., Rice, N. P., Lustgarten, M. S., So, K., Goodyear, L. J., Parnell, L. D., & Fielding, R. A. (2014). Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling. *Faseb j*, *28*(9), 4133-4147.
- Rivas, D. A., Peng, F., Benard, T., Silva, A. S. R. d., Fielding, R. A., & Margolis, L. M. (2021). miR-19b-3p is associated with a diametric response to resistance exercise in older adults and regulates skeletal muscle anabolism via PTEN inhibition. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *321*(6), C977-C991.
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2013). Real-Time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, *15*(2), 25-38.
- Roecker, K. (2008). Streit um des Kaisers Bart: Welche Laktatschwelle ist die beste? *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, *59*, 280-281.
- Roecker, K. (2013). Die sportmedizinische Laktatdiagnostik: Technische Rahmenbedingungen und Einsatzbereiche. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, *64*, 367-371.
- Roecker, K. (2020). Sportmedizinische Anwendung: Laktat- und Leistungsdiagnostik. In *Bewegung, Training, Leistung und Gesundheit : Handbuch Sport und Sportwissenschaft* (pp. 1-27). Berlin: Springer (Verlag),.
- Russell, A. P., Lamon, S., Boon, H., Wada, S., Güller, I., Brown, E. L., Chibalin, A. V., Zierath, J. R., Snow, R. J., Stepto, N., Wadley, G. D., & Akimoto, T. (2013). Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *J Physiol*, *591*(18), 4637-4653.
- Ruvinsky, I., & Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*, *31*(6), 342-348.
- Safdar, A., Abadi, A., Akhtar, M., Hettinga, B. P., & Tarnopolsky, M. A. (2009). miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PLoS One*, *4*(5), e5610.
- Safdar, A., Little, J. P., Stokl, A. J., Hettinga, B. P., Akhtar, M., & Tarnopolsky, M. A. (2011). Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and

- promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem*, 286(12), 10605-10617.
- Saiki Randall, K., Gelfand David, H., Stoffel, S., Scharf Stephen, J., Higuchi, R., Horn Glenn, T., Mullis Kary, B., & Erlich Henry, A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saleem, A., Carter, H. N., & Hood, D. A. (2014). p53 is necessary for the adaptive changes in cellular milieu subsequent to an acute bout of endurance exercise. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(3), C241-249.
- Saleem, A., & Hood, D. A. (2013). Acute exercise induces tumour suppressor protein p53 translocation to the mitochondria and promotes a p53-Tfam-mitochondrial DNA complex in skeletal muscle. *J Physiol*, 591(14), 3625-3636.
- Saltin, B., & Astrand, P. O. (1967). Maximal oxygen uptake in athletes. *Journal of Applied Physiology*, 23(3), 353-358.
- Saltin, B., Henriksson, J., Nygaard, E., Andersen, P., & Jansson, E. (1977). Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann N Y Acad Sci*, 301, 3-29.
- Sanchez, A. M., Csibi, A., Raibon, A., Cornille, K., Gay, S., Bernardi, H., & Candau, R. (2012). AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem*, 113(2), 695-710.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412.
- Santel, A., & Fuller, M. T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 114(Pt 5), 867-874.
- Sarker, N., Fabijan, J., Emes, R. D., Hemmatzadeh, F., Meers, J., Moreton, J., Owen, H., Seddon, J. M., Simmons, G., Speight, N., Trott, D., Woolford, L., & Tarlinton, R. E. (2018). Identification of stable reference genes for quantitative PCR in koalas. *Scientific Reports*, 8(1), 3364.
- Sartorelli, V., & Fulco, M. (2004). Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE*, 2004(244), re11.
- Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R., & Sandri, M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(6), C1248-1257.
- Sato, T., Yamamoto, T., & Sehara-Fujisawa, A. (2014). miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nature Communications*, 5(1), 4597.
- Scarpulla, R. C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1576(1-2), 1-14.
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447-1531.
- Schreiber, S. N., Knutti, D., Brogli, K., Uhlmann, T., & Kralli, A. (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem*, 278(11), 9013-9018.

- Schwarz, M., Urhausen, A., L, S., & W, K. (2002). Standards der Sportmedizin – Walking. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 53, 292-293.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, 5(3), R13.
- Seok, H. Y., Tatsuguchi, M., Callis, T. E., He, A., Pu, W. T., & Wang, D. Z. (2011). miR-155 inhibits expression of the MEF2A protein to repress skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*, 286(41), 35339-35346.
- Sharma, H. B., & Kailashiya, J. (2016). Gender Difference in Aerobic Capacity and the Contribution by Body Composition and Haemoglobin Concentration: A Study in Young Indian National Hockey Players. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10(11), CC09-CC13.
- Shete, A. N., Bute, S. S., & Deshmukh, P. R. (2014). A Study of VO<sub>2</sub> Max and Body Fat Percentage in Female Athletes. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 8(12), BC01-BC03.
- Shu, L., Zhao, H., Huang, W., Hou, G., Song, G., & Ma, H. (2020). Resveratrol Upregulates mmu-miR-363-3p via the PI3K-Akt Pathway to Improve Insulin Resistance Induced by a High-Fat Diet in Mice. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 13, 391-403.
- Silahtaroglu, A., Pfundheller, H., Koshkin, A., Tommerup, N., & Kauppinen, S. (2004). LNA-modified oligonucleotides are highly efficient as FISH probes. *Cytogenetic and Genome Research*, 107(1-2), 32-37.
- Silva, W. J., Graça, F. A., Cruz, A., Silvestre, J. G., Labeit, S., Miyabara, E. H., Yan, C. Y. I., Wang, D. Z., & Moriscot, A. S. (2019). miR-29c improves skeletal muscle mass and function throughout myocyte proliferation and differentiation and by repressing atrophy-related genes. *Acta Physiologica (Oxf)*, 226(4), e13278.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 7, 33.
- Simeonov, A., & Nikiforov, T. T. (2002). Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucleic Acids Research*, 30(17), e91-e91.
- Simonson, D. C., & DeFronzo, R. A. (1990). Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. *Am J Physiol*, 258(3 Pt 1), E399-412.
- Singh, G. B., Cowan, D. B., & Wang, D.-Z. (2020). Tiny Regulators of Massive Tissue: MicroRNAs in Skeletal Muscle Development, Myopathies, and Cancer Cachexia. *Frontiers in oncology*, 10, 598964-598964.
- Siracusa, J., Koulmann, N., & Banzet, S. (2018). Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 9(1), 20-27.
- Skinner, J. S., & McLellan, T. H. (1980). The Transition from Aerobic to Anaerobic Metabolism. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 51(1), 234-248.
- Small, E. M., O'Rourke, J. R., Moresi, V., Sutherland, L. B., McAnally, J., Gerard, R. D., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2010). Regulation of

- PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4218-4223.
- Smirmaul, B. P. C., Bertucci, D. R., & Teixeira, I. P. (2013). Is the VO<sub>2</sub>max that we measure really maximal? *Frontiers in Physiology*, 4, 203-203.
- Snell, P. G., Martin, W. H., Buckley, J. C., & Blomqvist, C. G. (1987). Maximal vascular leg conductance in trained and untrained men. *J Appl Physiol* (1985), 62(2), 606-610.
- Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G., & Rajewsky, N. (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8), 2746-2751.
- Soriano, F. X., Liesa, M., Bach, D., Chan, D. C., Palacín, M., & Zorzano, A. (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes*, 55(6), 1783-1791.
- Sparling, P. B. (1980). A Meta-Analysis of Studies Comparing Maximal Oxygen Uptake in Men and Women. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 51(3), 542-552.
- Stegmann, H., Kindermann, W., & Schnabel, A. (1981). Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *Int J Sports Med*, 2(3), 160-165.
- Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W. O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G. D., & Glass, D. J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, 14(3), 395-403.
- Su, S. H., Wu, C. H., Chiu, Y. L., Chang, S. J., Lo, H. H., Liao, K. H., Tsai, C. F., Tsai, T. N., Lin, C. H., Cheng, S. M., Cheng, C. C., & Wang, H. W. (2017). Dysregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 by Multiple miRNAs in Endothelial Colony-Forming Cells of Coronary Artery Disease. *J Vasc Res*, 54(1), 22-32.
- Suárez, Y., Fernández-Hernando, C., Yu, J., Gerber, S. A., Harrison, K. D., Pober, J. S., Iruela-Arispe, M. L., Merckenschlager, M., & Sessa, W. C. (2008). Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 14082-14087.
- Suárez, Y., & Sessa, W. C. (2009). MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circulation research*, 104(4), 442-454.
- Sun, C. Y., She, X. M., Qin, Y., Chu, Z. B., Chen, L., Ai, L. S., Zhang, L., & Hu, Y. (2013). miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis*, 34(2), 426-435.
- Sweetman, D., Goljanek, K., Rathjen, T., Oustanina, S., Braun, T., Dalmay, T., & Münsterberg, A. (2008). Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev Biol*, 321(2), 491-499.
- Taib, Z. (2004). Statistical analysis of oligonucleotide microarray data. *Comptes Rendus Biologies*, 327(3), 175-180.
- Talanian, J. L., Holloway, G. P., Snook, L. A., Heigenhauser, G. J., Bonen, A., & Spriet, L. L. (2010). Exercise training increases sarcolemmal and

- mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(2), E180-188.
- Tarca, A. L., Romero, R., & Draghici, S. (2006). Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American journal of obstetrics and gynecology*, 195(2), 373-388.
- Tarnowski, M., Kopytko, P., & Piotrowska, K. (2021). Epigenetic Regulation of Inflammatory Responses in the Context of Physical Activity. *Genes*, 12(9), 1313.
- Taylor, H. L., Buskirk, E., & Henschel, A. (1955). Maximal oxygen intake as an objective measure of cardio-respiratory performance. *J Appl Physiol*, 8(1), 73-80.
- Terzis, G., Georgiadis, G., Stratakos, G., Vogiatzis, I., Kavouras, S., Manta, P., Mascher, H., & Blomstrand, E. (2008). Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *European journal of applied physiology*, 102(2), 145-152.
- Thiel, A., Sudeck, G., Gropper, H., Maturana, F. M., Schubert, T., Srismith, D., Widmann, M., Behrens, S., Martus, P., Munz, B., Giel, K., Zipfel, S., & Nieß, A. M. (2020). The iReAct study - A biopsychosocial analysis of the individual response to physical activity. *Contemp Clin Trials Commun*, 17, 100508.
- Thornton, B., & Basu, C. (2015). Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design. In C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (pp. 173-179). Springer New York.
- Tompuri, T., Lintu, N., Savonen, K., Laitinen, T., Laaksonen, D., Jääskeläinen, J., & Lakka, T. A. (2015). Measures of cardiorespiratory fitness in relation to measures of body size and composition among children. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 35(6), 469-477.
- Tremblay, A., Simoneau, J. A., & Bouchard, C. (1994). Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. *Metabolism*, 43(7), 814-818.
- Tschopp, M., Held, T., Villiger, B., & Marti, B. (2001). Qualitätsstandards in der Ausdauerleistungsdiagnostik : ein gemeinsames Projekt von SGSM und «Swiss Olympic». In *Schweiz Z Sportmed. Sporttraumatol.* (Vol. 49, pp. S. 57-66).
- Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R. C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F. D., & Guan, K. L. (2012). YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol*, 14(12), 1322-1329.
- Ucar, A., Gupta, S. K., Fiedler, J., Erikci, E., Kardasinski, M., Batkai, S., Dangwal, S., Kumarswamy, R., Bang, C., Holzmann, A., Remke, J., Caprio, M., Jentzsch, C., Engelhardt, S., Geisendorf, S., Glas, C., Hofmann, T. G., Nessling, M., Richter, K., . . . Thum, T. (2012). The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nature Communications*, 3(1), 1078.
- Ultimo, S., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., McCubrey, J. A., Capitani, S., & Neri, L. M. (2018). Influence of physical exercise on microRNAs in

- skeletal muscle regeneration, aging and diseases. *Oncotarget*, *9*(24), 17220-17237.
- Vaes, E., Khan, M., & Mombaerts, P. (2014). Statistical analysis of differential gene expression relative to a fold change threshold on NanoString data of mouse odorant receptor genes. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 39.
- van de Worp, W., Theys, J., van Helvoort, A., & Langen, R. C. J. (2018). Regulation of muscle atrophy by microRNAs: 'AtromiRs' as potential target in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *21*(6), 423-429.
- van Rooij, E., Liu, N., & Olson, E. N. (2008). MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet*, *24*(4), 159-166.
- van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J., Jr., & Olson, E. N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*, *17*(5), 662-673.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., & Olson, E. N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, *316*(5824), 575-579.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, *3*(7), research0034.0031.
- Vega, R. B., Huss, J. M., & Kelly, D. P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*, *20*(5), 1868-1876.
- Vlachos, I. S., & Hatzigeorgiou, A. G. (2017). Functional Analysis of miRNAs Using the DIANA Tools Online Suite. In M. F. Schmidt (Ed.), *Drug Target miRNA: Methods and Protocols* (pp. 25-50). Springer New York.
- Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*, *43*(W1), W460-466.
- Vollaard, N. B., Constantin-Teodosiu, D., Fredriksson, K., Rooyackers, O., Jansson, E., Greenhaff, P. L., Timmons, J. A., & Sundberg, C. J. (2009). Systematic analysis of adaptations in aerobic capacity and submaximal energy metabolism provides a unique insight into determinants of human aerobic performance. *J Appl Physiol* (1985), *106*(5), 1479-1486.
- Vyas, D. R., Spangenburg, E. E., Abraha, T. W., Childs, T. E., & Booth, F. W. (2002). GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, *283*(2), C545-551.
- Wang, A. M., Doyle, M. V., & Mark, D. F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(24), 9717-9721.
- Wang, G., Gunic, E., Girardet, J. L., & Stoisavljevic, V. (1999). Conformationally locked nucleosides. Synthesis and hybridization properties of oligodeoxynucleotides containing 2',4'-C-bridged 2'-deoxynucleosides. *Bioorg Med Chem Lett*, *9*(8), 1147-1150.

- Wang, P.-Y., Zhuang, J., & Hwang, P. M. (2012). p53: exercise capacity and metabolism. *Current opinion in oncology*, 24(1), 76-82.
- Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*, 15(2), 261-271.
- Wang, W., Li, X., & Chen, J. (2015). Energy crisis and the Hippo pathway. *Cell Cycle*, 14(13), 1995-1996.
- Wang, W., Xiao, Z. D., Li, X., Aziz, K. E., Gan, B., Johnson, R. L., & Chen, J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat Cell Biol*, 17(4), 490-499.
- Wang, X., Ling, C. C., Li, L., Qin, Y., Qi, J., Liu, X., You, B., Shi, Y., Zhang, J., Jiang, Q., Xu, H., Sun, C., You, Y., Chai, R., & Liu, D. (2016). MicroRNA-10a/10b represses a novel target gene mib1 to regulate angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 110(1), 140-150.
- Wang, Y., Zhu, W., & Levy, D. E. (2006). Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methods*, 39(4), 356-362.
- Wasserman, K., Hansen, J. E., Sue, D. Y., Whipp, B. J., & Froelicher, V. F. (1987). Principles of Exercise Testing and Interpretation. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*, 7(4).
- Wasserman, K., Whipp, B. J., Koysl, S. N., & Beaver, W. L. (1973). Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol*, 35(2), 236-243.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Watt, K. I., Goodman, C. A., Hornberger, T. A., & Gregorevic, P. (2018). The Hippo Signaling Pathway in the Regulation of Skeletal Muscle Mass and Function. *Exercise and sport sciences reviews*, 46(2), 92-96.
- Watt, K. I., Henstridge, D. C., Ziemann, M., Sim, C. B., Montgomery, M. K., Samochoa-Bonet, D., Parker, B. L., Dodd, G. T., Bond, S. T., Salmi, T. M., Lee, R. S., Thomson, R. E., Hagg, A., Davey, J. R., Qian, H., Koopman, R., El-Osta, A., Greenfield, J. R., Watt, M. J., . . . Gregorevic, P. (2021). Yap regulates skeletal muscle fatty acid oxidation and adiposity in metabolic disease. *Nature Communications*, 12(1), 2887.
- Watt, K. I., Turner, B. J., Hagg, A., Zhang, X., Davey, J. R., Qian, H., Beyer, C., Winbanks, C. E., Harvey, K. F., & Gregorevic, P. (2015). The Hippo pathway effector YAP is a critical regulator of skeletal muscle fibre size. *Nat Commun*, 6, 6048.
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*, 56(11), 1733-1741.
- Wei, F., Liu, Y., Guo, Y., Xiang, A., Wang, G., Xue, X., & Lu, Z. (2013). MiR-99b-targeted mTOR induction contributes to irradiation resistance in pancreatic cancer. *Molecular cancer*, 12, 81.
- Wei, W., Zhang, W. Y., Bai, J. B., Zhang, H. X., Zhao, Y. Y., Li, X. Y., & Zhao, S. H. (2016). The NF- $\kappa$ B-modulated microRNAs miR-195 and miR-497

- inhibit myoblast proliferation by targeting Igf1r, Insr and cyclin genes. *J Cell Sci*, 129(1), 39-50.
- Wenger, H. A., & Bell, G. J. (1986). The interactions of intensity, frequency and duration of exercise training in altering cardiorespiratory fitness. *Sports Med*, 3(5), 346-356.
- Wheelan, S. J., Martínez Murillo, F., & Boeke, J. D. (2008). The incredible shrinking world of DNA microarrays. *Molecular bioSystems*, 4(7), 726-732.
- Widmann, M., Mattioni Maturana, F., Burgstahler, C., Erz, G., Schellhorn, P., Fragasso, A., Schmitt, A., Nieß, A. M., & Munz, B. (2022). miRNAs as markers for the development of individualized training regimens: A pilot study. *Physiological Reports*, 10(5), e15217.
- Widmann, M., Nieß, A. M., & Munz, B. (2019). Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. *Sports Med*, 49(4), 509-523.
- Wilkinson, S. B., Phillips, S. M., Atherton, P. J., Patel, R., Yarasheski, K. E., Tarnopolsky, M. A., & Rennie, M. J. (2008). Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *The Journal of Physiology*, 586(15), 3701-3717.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75-85.
- Wright, D. C., Geiger, P. C., Han, D. H., Jones, T. E., & Holloszy, J. O. (2007). Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 282(26), 18793-18799.
- Wrulich, O. A., & Überall, F. (2009). DNS-Mikroarrays – Verbesserung der analytischen Plattformen zur Beschreibung molekularer Wirkmuster von Naturstoffpräparaten oder Science Fiction? *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin / Swiss Journal of Integrative Medicine*, 21(7-8), 348-355.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., & Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115-124.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*.
- Yamamoto, H., Morino, K., Nishio, Y., Ugi, S., Yoshizaki, T., Kashiwagi, A., & Maegawa, H. (2012). MicroRNA-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(12), E1419-E1427.
- Yan, B., Zhu, C. D., Guo, J. T., Zhao, L. H., & Zhao, J. L. (2013). miR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression. *J Exp Biol*, 216(Pt 7), 1265-1269.



- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, *17*(24), 3011-3016.
- Yin, K.-J., Olsen, K., Hamblin, M., Zhang, J., Schwendeman, S. P., & Chen, Y. E. (2012). Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia. *The Journal of biological chemistry*, *287*(32), 27055-27064.
- Yokomizo, T., Hasegawa, K., Ishitobi, H., Osato, M., Ema, M., Ito, Y., Yamamoto, M., & Takahashi, S. (2008). Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse. *Blood*, *111*(8), 4075-4080.
- Zacharewicz, E., Della Gatta, P., Reynolds, J., Garnham, A., Crowley, T., Russell, A. P., & Lamon, S. (2014). Identification of MicroRNAs Linked to Regulators of Muscle Protein Synthesis and Regeneration in Young and Old Skeletal Muscle. *PLoS One*, *9*(12), e114009.
- Zacharewicz, E., Lamon, S., & Russell, A. (2013). MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease [Review]. *Frontiers in Physiology*, *4*.
- Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol*, *166*(3), 347-357.
- Zhang, L., Huang, D., Wang, Q., Shen, D., Wang, Y., Chen, B., Zhang, J., & Gai, L. (2014). MiR-132 Inhibits Expression of SIRT1 and Induces Pro-inflammatory Processes of Vascular Endothelial Inflammation through Blockade of the SREBP-1c Metabolic Pathway. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *28*(4), 303-311.
- Zhang, Y., Yan, H., Zhou, P., Zhang, Z., Liu, J., & Zhang, H. (2019). MicroRNA-152 Promotes Slow-Twitch Myofiber Formation via Targeting Uncoupling Protein-3 Gene. *Animals (Basel)*, *9*(9).
- Zhao, B., Erwin, A., & Xue, B. (2018). How many differentially expressed genes: A perspective from the comparison of genotypic and phenotypic distances. *Genomics*, *110*(1), 67-73.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J., & Han, J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol*, *19*(1), 21-30.
- Zhao, Q., Kang, Y., Wang, H.-Y., Guan, W.-J., Li, X.-C., Jiang, L., He, X.-H., Pu, Y.-B., Han, J.-L., Ma, Y.-H., & Zhao, Q.-J. (2016). Expression profiling and functional characterization of miR-192 throughout sheep skeletal muscle development. *Scientific Reports*, *6*(1), 30281.
- Zhou, H., Huang, X., Cui, H., Luo, X., Tang, Y., Chen, S., Wu, L., & Shen, N. (2010). miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, *116*(26), 5885-5894.
- Zhou, Q., Shi, C., Lv, Y., Zhao, C., Jiao, Z., & Wang, T. (2020). Circulating microRNAs in Response to Exercise Training in Healthy Adults [Original Research]. *Frontiers in Genetics*, *11*.
- Zhu, Y., Long, H.-T., Zeng, L., Tang, Y.-f., Zhao, R.-b., Lin, Z.-y., Zhao, S.-s., & Cheng, L. (2019). MiR-19b-3p regulates osteogenic differentiation of

PDGFR $\alpha$ + muscle cells by specifically targeting PTEN. *Cell Biology International*, 43(5), 565-573.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik, Abteilung Sportmedizin/Innere Medizin V, am Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Dr. Angelika Schmitt durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Barbara Munz, Leitung des molekular- und zellbiologischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Tübingen.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Angelika Schmitt, Annunziata Fragasso und Manuel Widmann von mir eigenständig durchgeführt. Die Aufreinigung der Skelettmuskelbiopsien, die zum Zeitpunkt T0 gewonnen wurden, wurde durch Manuel Widmann, Abteilung Sportmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, durchgeführt. Die Erhebung der anthropometrischen und physiologischen Daten sowie die Gewinnung der Skelettmuskelbiopsien wurden durch Mitarbeitende der Abteilung Sportmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, im Rahmen der iReAct-Studie (Thiel et al., 2020) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 25.05.2022

## **8 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Dr. Angelika Schmitt und Annunziata Fragasso bedanke, die mir bei den experimentellen Versuchen tatkräftig zur Seite standen und ohne deren Unterstützung das Verfassen dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Barbara Munz für die Beantwortung meiner Fragen und die konstruktiven Hilfestellungen. Letztendlich bedanke ich mich bei Mirjam Hohner für das Korrekturlesen dieser Arbeit und mein besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich bei all meinen Entscheidungen unterstützt haben.