

**Die Rolle des MAPK Signalweges
bei Ausdauersport in Leber und Muskel**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Andrea Drescher, geb. Hüller

aus Jena

Tübingen

2015

Tag der mündlichen Prüfung:

02.07. 2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alfred Nordheim

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Cora Weigert

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen in der Abteilung IV der Medizinischen Klinik unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Hans-Ulrich Häring durchgeführt.

Mein besonderer und herzlichster Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Cora Weigert für die stete Unterstützung dieser Arbeit und meiner Person. Die Ideen und Anregungen, die ich in vielen Diskussionen mit ihr erfahren durfte, haben über die Maßen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Durch ihr Verständnis und Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten konnte ich sowohl fachlich als auch menschlich wachsen und reifen.

Herrn Prof. Dr. Alfred Nordheim danke ich ebenfalls herzlichst für seine Bereitschaft und das Interesse an diesem Thema sowie für die Möglichkeit an der Universität Tübingen promovieren zu dürfen.

Auch meine Kollegen Prof. Dr. Erwin Schleicher, Prof. Dr. Rainer Lehmann, PD Dr. Andreas Peter, Dr. Miriam Hoene, Dr. Sabine Neukamm, Christian Klingler, Lisa Kappler, Ann-Kathrin Horlacher, Heike Runge, Mareike Walenta, Julian Geiger und Magnus Wolf waren eine beständige Quelle der Inspiration und Motivation. Vielen Dank für die angenehme Zusammenarbeit und das Gefühl auch an schlechten Tagen nie den Mut verlieren zu müssen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Kindern Julia, Janik und Hannah für ihre Geduld und ihr doch schon erstaunliches Verständnis dafür, dass man sein Ziel nie aus den Augen verlieren sollte.

Teile dieser Arbeit wurden bei Kongressen präsentiert und als Abstract veröffentlicht:

Poster

A. Drescher, M. Hoene, H.-U. Häring, E. Schleicher, C. Weigert

Role of ERK 1/2 in early gene expression in muscle and liver after acute endurance exercise.

ADA 74th scientific session 2014, San Francisco, CA, USA

Vorträge

Drescher, A; Hoene, M; Häring, HU; Schleicher, E; Weigert, C: Bedeutung des MAPK Signalweges für die Genexpression und die metabolische Anpassung während Ausdauer-sports in Leber und Muskel. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2013, 8 S01

Beteiligung an Publikationen als Koautor

Sartorius T, Peter A, Schulz N, Drescher A, Bergheim I, Machann J, Schick F, Siegel-Axel D, Schürmann A, Weigert C, Häring HU, Hennige AM. Cinnamon extract improves insulin sensitivity in the brain and lowers liver fat in mouse models of obesity. *PloS One*. 9(3):e92358, 2014

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Die Bedeutung von Ausdauersport für die Prävention und Therapie chronischer Erkrankungen	3
2.2 Der Skelettmuskel bei Ausdauersport	4
2.2.1 Der Aufbau des Skelettmuskels	4
2.2.2 Der Energiemetabolismus des Skelettmuskels bei Ausdauersport	4
2.2.3 Transkriptionelle Regulationsmechanismen im Skelettmuskel bei Ausdauersport	5
2.3 Die Rolle der Leber während einer 60-minütigen Ausdauerbelastung	9
2.3.1 Die Rolle der Leber im Glukosestoffwechsel	9
2.3.2 Die Rolle der Leber im Lipidstoffwechsel	10
2.3.3 Die Leber und Nahrungsrestriktion	11
2.3.4 Die Leber und Sport	14
2.4 Der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Coactivator 1-alpha (PGC1α)	16
2.4.1 Die Rolle von PGC1 α im Skelettmuskel	16
2.4.2 Die Rolle von PGC1 α in der Leber	17
2.5 Die Bedeutung des MAPK Signalweges bei Ausdauersport in Muskel und Leber	18
2.5.1 Der MAPK Signalweg	18
2.5.2 Die Bedeutung des MAPK Signalweges bei Ausdauersport im Skelettmuskel	21
2.5.3 Die Bedeutung des MAPK Signalweges bei Ausdauersport in der Leber	23
2.6 Die Bedeutung früh exprimierter Gene (IEG) und Zytokine bei Ausdauersport in Leber und Muskel	23
2.6.1 Immediate early genes (IEG)	23
2.6.2 IEGs und Sport	25
2.6.3 Zytokine und Sport	26
3 ZIELSTELLUNG	28
4 MATERIAL	30
4.1 Geräteliste	30

4.2	Chemikalien	31
4.3	Injektionen	33
4.4	Inhibitoren	33
4.5	Kommerzielle Kits, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	34
4.6	Computer Software	36
4.7	Antikörper	36
4.7.1	Primäre Antikörper	36
4.7.2	Sekundäre Antikörper	38
4.7.3	Kommerzielle Primer Assays für quantitative Real-time (qRT)-PCR	39
5	METHODEN	40
5.1	Tierexperimentelle Methoden	40
5.1.1	Mausmodell	40
5.1.2	Tierhaltung	40
5.1.3	Ausdauerlauf der Mäuse auf einem Laufband	40
5.1.4	Nahrungsrestriktion und Wiederfütterung	41
5.1.5	Applikation des Inhibitors U0126	42
5.2	Ausdauerlauf Protokolle	44
5.2.1	Einmaliger 60-minütiger Ausdauerlauf	44
5.2.2	60-minütiger Ausdauerlauf mit anschließender Erholungsphase	45
5.3	Blut- und Gewebeentnahme und Analysen	45
5.3.1	Plasmaparameter	46
5.3.2	Glykogenbestimmung	47
5.3.3	Messung der Triglyzeride in der Leber	47
5.3.4	Aufbereitung der Gewebelysate	48
5.4	Zellkultur	49
5.4.1	Verwendete Zelllinien	49
5.4.2	C2C12 Kultivierung	49
5.4.3	Zellsplittung	49
5.4.4	Transfektion der Zellen mit siRNA	50
5.4.5	Applikation der Inhibitoren	50
5.4.6	EP-Stimulation der differenzierten C2C12 Zellen	51
5.5	Proteinbiochemische Methoden	52

5.5.1	Zellyse	52
5.5.2	Nukleus / Zytosol Fraktionierung	53
5.5.3	Proteinbestimmung und Aufbereitung der Proben für SDS-Page	54
5.5.4	SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacralamid Gel Elektrophorese)	55
5.5.5	Western Blot	56
5.5.6	Ponceaurot Färbung	57
5.5.7	Blockieren	57
5.5.8	Immundetektion	57
5.5.9	Strippen	58
5.6	Molekularbiologische Methoden	59
5.6.1	Isolation der Gesamt-RNA	59
5.6.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	60
5.6.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	60
5.6.4	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	61
6	ERGEBNISSE	63
6.1	Der Einfluss des Energiestatus auf eine 60-minütige Ausdauerbelastung	63
6.1.1	Der Einfluss von Ausdauersport und Nahrungsrestriktion auf den Metabolismus	63
6.1.2	Keine additive Wirkung von Nahrungsrestriktion und 60-minütiger Ausdauerbelastung auf die Expression von Igfbp-1, Ppargc1a und G6pc in Leber und Muskel	65
6.1.3	ERK1/2 ist nach Ausdauersport in der Leber unabhängig vom Energiestatus aktiviert	67
6.1.4	Der Einfluss der Energiereserven für die IEG Expression in der Leber nach Ausdauersport	68
6.2	Der Einfluss der MAPK Signalwege auf die IEG Expression in Leber und Muskel	70
6.2.1	Die Aktivierung der MAPK Signalwege nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung und der Inhibition mit U0126 in Leber und Muskel	71
6.2.2	Vergleich der IEG Genexpression nach U0126 Applikation in Leber und Skelettmuskel nach Ausdauersport	73
6.2.3	Eine Hemmung von ERK1/2 hat in der Leber keine weiteren Auswirkungen auf die Genexpression von Ppargc1a, Pdk4 und G6pc	74
6.2.4	Die Applikation von U0126 verursacht keine signifikanten Unterschiede in der metabolischen Antwort auf Ausdauersport	75
6.2.5	Die Phosphorylierung von ELK-1 ist nach U0126 Applikation nur im Muskel erniedrigt	78
6.3	Die IEG Genexpression infolge einer Deaktivierung von ERK1/2 nach Ausdauersport mit dreistündiger Erholungsphase in Leber und Muskel	79
6.3.1	Der Einfluss einer U0126 Applikation nach Ausdauersport und anschließender dreistündiger Erholungsphase auf den Metabolismus	80
6.4	Die Anwendung des Inhibitors U0126 in einem ‚In vitro Exercise Modell‘	82

6.4.1	Keine Hemmung der Genexpression von PGC1 α und CXCL1 nach EP-Stimulation durch Inhibition der ERK1/2 Aktivität	82
6.4.2	U0126 und PD98059, jedoch nicht PD184352 aktivieren die AMPK	84
6.4.3	Auch PD184352 hemmt nicht die Genexpression von Ppargc1a und Cxcl1	85
6.4.4	Eine Herunterregulierung von ERK2 mittels siRNA Transfektion führt ebenfalls nicht zu einer Hemmung der Cxcl1 Expression	86
6.4.5	Die Applikation des JNK Inhibitors VIII hemmt die EPS-induzierte Expression von Cxcl1 in C2C12 Zellen	87
6.4.6	Welcher Signalweg ist in der Leber verantwortlich für die IEG Expression	89
6.5	ERK1/2 und JNK sind nicht in allen Muskeltypen nach Ausdauersport phosphoryliert	91
6.6	Der Einfluss einer 60-minütigen Ausdauerbelastung auf die Expression von FGF21 in Plasma, Leber und Skelettmuskel	93
7	DISKUSSION	96
7.1.1	Folgen einer Nahrungsrestriktion mit zusätzlicher Ausdauerbelastung in Leber und Muskel	96
7.1.2	Regulation der IEG Expression in Leber und Muskel nach Nahrungsrestriktion und Ausdauersport	98
7.1.3	Die Glykogenspiegel der Leber variieren in Abhängigkeit der aktiven und der inaktiven Phase der Mäuse	99
7.1.4	Aktivierung von MAPK in der Leber durch Ausdauersport	101
7.2	Ist die Aktivierung von ERK1/2 an der Sport-induzierten Genexpression in Leber und Muskel beteiligt?	102
7.2.1	Die Wirkung von U0126 auf die Ausdauersport-induzierte Genexpression in Leber und Skelettmuskel	102
7.2.2	U0126 wirkt nicht spezifisch	103
7.2.3	Mögliche Konsequenzen der unspezifischen Effektivität des Inhibitors	103
7.2.4	Die JNK MAPK ist im Skelettmuskel entscheidend für die Ausdauersport-induzierte IEG- und Zytokin Expression	106
7.2.5	Mögliche Ursachen für eine Beeinflussung der JNK MAPK durch U0126	107
7.3	Der ERK1/2 und JNK MAPK Signalweg ist nach einem Ausdauersport nicht in allen Skelettmuskeltypen aktiviert	109
7.4	Die Bedeutung von FGF21 in Leber und Skelettmuskel bei Ausdauersport	111
7.5	Schlussfolgerung und Ausblick	112
8	LITERATUR	113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	152
TABELLENVERZEICHNIS	154

Abkürzungsverzeichnis

SI Standardeinheiten werden nicht aufgezählt

ADP	Adenosindiphosphat	CPT1	Carnitin-Palmito- yltransferase 1
Akt/PKB	Proteinkinase B		
AMPK	AMP-aktivierte Pro- teinkinase	CRE	<i>cAMP-responsive-ele- ment</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>	CREB	<i>cAMP response ele- ment-binding protein</i>
ATF	<i>Activating transcrip- tion factor</i>	CRTC2/TORC2	CREB- regulierter Transkriptionsfaktor 2
ATGL	Adipozyten-Triglyze- rid-Lipase	CXCL1	<i>Chemokin (C-X-C Mo- tif) ligand 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat	CXCR	Chemokin Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin	Cyt c	Cytochrom c
C/EBPs	<i>CCAAT-enhancer- binding-proteins</i>	DIO	<i>Diet-induced-obesity</i>
C2C12	Mausmyoblasten	DMSO	Dimethylsulfoxid
Ca ²⁺	Calcium	DNA	Desoxyribonuklein- säure
CaMK	Calcium/Calmodulin- abhängige Protein- kinase	DPBS	<i>Dulbecco's</i> Phosphat- gepufferte Salzlösung
cAMP	cyclisches Adenosin- monophosphat	DUSP	Dualspezifische Phos- phatasen
CAT	Katalase	ECL	verstärkte Chemilumi- neszenz
CBP	CREB-Bindeprotein	EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
CD36	<i>Fatty acid translocase</i>	EDTA	Ethylendiamintetra- acetat
cDNA	komplementäre DNA	EGTA	Ethylenglykoltetraes- sigsäure
ChREBP	<i>Carbohydrate response element-bin- ding Protein</i>		
COX1	Cytochrom-c-Oxidase		

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
ELK1	<i>ETS domain-containing protein Elk-1</i>	HepG2	Humane Leberkarzinomzellen
ER	Endoplasmatisches Retikulum	HFD	Fettreiche Nahrungszufuhr (<i>High Fat Diet</i>)
ERK	Extrazelluläre Kinase	HNF4	Nukleärer Hepatozyten Faktor 4
FBP	Fruktose-1,6-Bisphosphatase	HRP	Meerrettich-Peroxidase
FCS	Fötales Kälberserum	HSL	Hormon-sensitive Lipase
FFA	Freie Fettsäure	HSP	Hitzeschockprotein
FGF21	<i>Fibroblast-growth-factor 21</i>	i.p.	intraperitoneal
FGFR	FGF-Rezeptor	IEG	<i>Immediate early gene</i>
Fos	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>	IGF	Insulin-like growth factor
FOXO1	<i>Forkhead-box Protein O1</i>	IGFBP1	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i>
FT	<i>Fast-twitch</i>	IKK	Inhibitorische κ B Kinase
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase	IL	Interleukin
GADD45	<i>Growth arrest and DNA damage</i>	IMTG	Intramyozelluläre Triglyzeride
GDP	Guanosindiphosphat	INS-1E	Pankreatische Inselzellen
GLUT	Glukosetransporter	IR	Insulinrezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>	JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
GSK	Glykogensynthase-Kinase 3	Jun	<i>Jun protooncogene</i>
GTP	Guanosintriphosphat		
HDAC	Histon-Deacetylase		

kDa	Kilodalton	NLK	<i>Nemo-like-kinase</i>
KO	<i>Knockout</i>	NRF	<i>Nuclear respiratory factor</i>
LCAD	<i>Long-chain Acyl-CoA dehydrogenase</i>	<i>ob/ob</i> Mäuse	Adipöse Mäuse
LD	Latissimus dorsi	PC	Pyruvatcarboxylase
LPL	Lipoproteinlipase	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase	PDK4	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isozyms 4
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase Kinase	PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
MDM2	E3-Ubiquitin-Protein Ligase	PGC1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>	PKA	Proteinkinase-A
MEK	MAP Kinase ERK Kinase	PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
MKK4	Dualspezifische Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4	Pro	Prolin
MKK7	Dualspezifische Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7	PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
MSK	Mitogen-und Stress-aktivierte Kinase	qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase reaction</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	RIA	Radioimmunassay
NaCl	Natriumchlorid	RNA	Ribonukleinsäure
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	RSK2	p90 ribosomale S6 Kinase
		RT	Raumtemperatur

RTK	Rezeptor-Tyrosin- Kinase	TCF	<i>Ternary complex fac- tor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	TEMED	Tetramethylethylendi- amin
SEM	<i>standard error of the mean</i>	TG	Triglyzeride
Ser	Serin	Thr	Threonin
SGK1	Serum- und Glukokor- tikoid-regulierte Kinase 1	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
SH2	Src-homologe Do- mäne 2	TP53INP1	<i>p53 inducible nuclear protein</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	TRE	<i>TPA-responsive ele- ment</i>
SIRT1	Sirtuin 1	Tyr	Tyrosin
SOCS3	<i>Supressor of cytokine signaling 3</i>	U	Unit
SOD	Superoxiddismutase	V	Volumen
Sos	<i>son of sevenless</i>	WAT	Weißes Fettgewebe
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum	WT	Wildtyp
SRE	<i>Serum response ele- ment</i>		
SREBP	<i>Sterol regulatory ele- ment-binding protein</i>		
SRF	<i>Serum response factor</i>		
ST	<i>Slow-twitch</i>		
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcrip- tion</i>		
Sybr-Green	$C_{32}H_{37}N_4S^+$		
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1		
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2		

1 Zusammenfassung

Körperliche Aktivität wie Ausdauersport aber auch eine Nahrungsrestriktion sind verbunden mit einer Vielzahl positiver und auch stressbedingter Adaptationen des Stoffwechsels in der Leber und den Skelettmuskeln, deren exakte molekulare Regulationsmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des ERK1/2 MAPK Signalweges und der Energiespeicher auf die Genexpression in Leber und Skelettmuskel während einer sportlichen Ausdauerbelastung bei Mäusen zu untersuchen. Die Bestimmung der Genexpression verschiedener *Immediate early genes* (IEGs) und metabolisch relevanter Gene sollten Aufschluss über die dabei ablaufenden Signalwege geben.

Zunächst wurde die Auswirkung von depletierten Glykogenspiegeln (Nahrungsrestriktion für 21 Stunden) auf die Genexpression nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf bei C57Bl/6 Mäusen im Vergleich zu maximalem Glykogengehalt (6 Stunden Wiederfütterung) untersucht. Durch die Nahrungsrestriktion wurden eine vermehrte IEG-Expression (*c-Fos*, *c-Jun*, *Gadd45g*, *Trp53*) und die Expression von *Irfp1* und *Ppargc1a* (PGC1 α) in der Leber von Mäusen induziert, wobei eine zusätzliche Belastung in Form eines Ausdauerlaufs keine additiven Effekte verursacht. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Skelettmuskel unter beiden Bedingungen ein Anstieg der IEG-Expression nach dem Ausdauerlauf.

Um den Einfluss des ERK1/2 MAPK Signalweges auf die Ausdauersport-induzierte IEG Expression in Leber und Skelettmuskel zu untersuchen wurde der MEK Inhibitor U0126 C57Bl/6 Mäusen intraperitoneal appliziert und nachfolgend die Genexpression verschiedener IEGs und metabolisch relevanter Gene gemessen. Um mögliche Konsequenzen der MAPK Hemmung auf den Metabolismus aufzuzeigen, wurden verschiedene Parameter in Plasma, Leber und Skelettmuskel untersucht.

Die Hemmung der MAPK Aktivität durch den MEK Inhibitor U0126 verursachte nur im Skelettmuskel, nicht aber in der Leber von Mäusen eine Erniedrigung der Ausdauersport-induzierten IEG und Zytokin Expression.

Interessanterweise beeinflusste die Applikation von U0126 *in vivo* nicht nur die ERK1/2, sondern auch die JNK Aktivität in beiden Geweben. In einem „*in vitro Exercise Modell*“ mit Mausmuskelnzellen (C2C12) konnte mittels der Applikation von U0126 und eines JNK Inhibitors (JNK Inhibitor VIII) verifiziert werden, dass die Hemmung der Ausdauersport-induzierten IEG Expression im Skelettmuskel nicht durch die ERK1/2, sondern durch die JNK MAPK verur-

sacht wird. Dagegen ist die Ausdauersport-induzierte IEG Expression in der Leber vom Energiestatus dieser abhängig, wobei die dabei beteiligten Signalwege noch geklärt werden müssen. Die Ergebnisse haben zudem gezeigt, dass der MEK Inhibitor U0126 auch *in vivo* auch die JNK Aktivität hemmen kann. Dieser Aspekt könnte für eine zukünftige pharmakologische Anwendung von U0126 von großer Bedeutung sein, da hierbei eine unerwartete Beeinflussung weiterer Signalwege zu bedenken ist.

2 Einleitung

2.1 Die Bedeutung von Ausdauersport für die Prävention und Therapie chronischer Erkrankungen

Diabetes Mellitus gehört heute zu den häufigsten Volkskrankheiten. Weltweit gibt es mittlerweile 382 Mio. Menschen, die an Typ-1 oder Typ-2 Diabetes erkrankt sind (Stand 2013; <http://idf.org>); dies entspricht ca. 5,34 % der Weltbevölkerung. Schätzungen zufolge wird diese Zahl bis 2030 auf 438 Mio. ansteigen (<http://dzd-ev.de>). Es besteht heute Konsens darüber, dass der hohe Anteil an Diabetes-Typ-2-Erkrankungen vor allem auf eine ungesunde Ernährung und einen Mangel an körperlicher Bewegung zurückzuführen ist (<http://www.diabetes-heute.uni-duesseldorf.de>).

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Ausdauersport und körperliche Aktivität mit einer verbesserten Insulinsensitivität und kardiorespiratorischer Fitness sowie einer Prävention von Typ-2 Diabetes Mellitus (T2DM) einhergehen (1-5). Da eine Fettleibigkeit eng mit einer T2DM Entstehung verbunden ist (6), wurden vor allem in den letzten 15 - 20 Jahren weltweit sogenannte Lebensstilinterventionsstudien durchgeführt, in denen durch eine Gewichtsreduktion und eine Steigerung der körperlichen Aktivität versucht wurde, einer T2DM Entstehung vorzubeugen (7-13). Eine der größten Präventionsstudien (*U.S. Diabetes Prevention Program*, DPP) resultierte bei Probanden nach einer 4-jährigen Lebensstilintervention inklusive einer Ernährungsumstellung und einem wöchentlichen moderaten Ausdauersportprogramm von 150 min pro Woche in Form von schnellerem Laufen in einem 58 % verminderten T2DM-Risiko und einem 7 %igen Gewichtsverlust (14). Eine weitere Präventionsstudie konnte nach einer Lebensstilintervention eine 12 %ige Verbesserung der kardiorespiratorischen Fitness aufzeigen (15).

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass körperliche Bewegung und Ausdauersport das Auftreten eines T2DM und kardiovaskulärer Erkrankungen verhindern können, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, dass dabei auch genetische Faktoren und andere Umweltbedingungen eine wichtige Rolle spielen (12).

2.2 Der Skelettmuskel bei Ausdauersport

2.2.1 Der Aufbau des Skelettmuskels

Durch die mechanische Beanspruchung und die Muskularbeit gilt der Skelettmuskel als das am meisten beeinflusste Organ während einer Ausdauerbelastung. Aus diesem Grund und der relativ guten Zugänglichkeit gehört er auch zu den am besten untersuchten Geweben während bzw. nach einer Ausdauerbelastung.

Der Skelettmuskel besteht bei Säugetieren aus verschiedenen Muskelfasertypen, die hauptsächlich in 4 große Gruppen unterteilt werden (16). Die Unterteilung erfolgt in langsam-zuckende (*Slow-twitch* (ST)), oxidative (Typ 1) Muskelfasern, schnell-zuckende (*Fast-twitch* (FT)), oxidative (Typ 2A) Muskelfasern, FT glykolytische (Typ 2B) Muskelfasern sowie Typ 2X Muskelfasern (16). Die Subgruppen 2A und 2X findet man vor allem in menschlichen Skelettmuskeln, während bei Nagetieren die Typ 2B Muskelfasern überwiegen (17). Muskelfasern vom Typ 1 besitzen durch ihren hohen oxidativen Charakter eine rote Farbe, während die 2B und 2X Muskelfasern weiß sind und 2A Muskelfasern eine intermediäre Farbe besitzen. Die unterschiedlichen Farben sind auf die Menge an Myoglobin in den entsprechenden Muskeln zurückzuführen (17). Während einer Ausdauerbelastung mit niedriger Intensität findet hauptsächlich eine Rekrutierung der ST-Typ 1 Muskelfasern statt.

2.2.2 Der Energiemetabolismus des Skelettmuskels bei Ausdauersport

Während einer Ausdauerbelastung ist der Energiebedarf im Skelettmuskel erhöht. Die dafür benötigte Energie wird größtenteils aus der Oxidation von Fettsäuren und Kohlenhydraten gewonnen (17-19). Dabei ist der Verbrauch der Energiesubstrate sowohl abhängig von der Dauer als auch von der Intensität der Belastung (18, 20, 21). Ausdauerbelastungen, die über mehrere Stunden andauern, werden zu 70 % über den Umsatz von freien Fettsäuren sichergestellt (18). Die hauptsächlichen Energiequellen für die arbeitende Muskulatur bei einer Ausdauerbelastung sind die intramuskulären Glykogenspeicher, die Plasmaglukose aus den hepatischen Glykogenspeichern, die intramyozellulären Triglyzeride (IMTG) sowie die Fettsäuren aus dem subkutanen Fettgewebe (18, 20). Die wesentlichste und schnellste Energielieferung erfolgt über den Abbau von Muskelglykogen und die IMTG (18). Mit zunehmender Belastungsintensität nimmt jedoch die intramuskuläre Fettsäureoxidation ab. Dies könnte teilweise an der vermehrten Rekrutierung von Typ 2 Muskelfasern liegen, die eine geringere Aktivität von Enzymen der Fettsäureoxidation besitzen (18). Auch der Anstieg von Calcium (Ca^{2+}) während der Muskelkontraktion stimuliert zum einen die intramuskuläre Glykogenolyse und zum anderen den Pyruvat-

Dehydrogenase-Komplex (PDC), was letztendlich zu einem präferierten Kohlenhydrat-Stoffwechsel führt (18).

Für seine Energieproduktion ist der Skelettmuskel stark abhängig von der oxidativen Phosphorylierung (17). Während eines intensiven Ausdauersports steigt der Sauerstoffverbrauch im Skelettmuskel rasant an und die lokale Durchblutung wie auch die Umsatzrate des Citratzyklus werden gesteigert. Somit ist der Skelettmuskel bei Ausdauersport der wichtigste Ort des katabolen Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus für die Energieproduktion (17).

2.2.3 Transkriptionelle Regulationsmechanismen im Skelettmuskel bei Ausdauersport

2.2.3.1 Die Regulation der Energiezufuhr im Skelettmuskel bei Ausdauersport

Es ist seit längerem bekannt, dass akuter Ausdauersport durch einen verstärkten Glukosetransport sowie einer verbesserten Insulinsensitivität des Skelettmuskels insgesamt zu einer verbesserten Glukosehomöostase führt. Langfristig kommt es auch zu einer Veränderung der Expression von Proteinen, die z. B. an der Umwandlung der Muskelfasern und der Erhöhung der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind (3, 22).

Der Skelettmuskel spielt eine wichtige Rolle in der glykämischen Kontrolle und der metabolischen Homöostase des gesamten Organismus. Der gesteigerte Glukosetransport im Skelettmuskel während eines Ausdauersports ist primär auf die Translokation des Glukose-Transporters 4 (GLUT4) von der intrazellulären Seite an das Sarkolemma oder den Transversal-Tubulus zurückzuführen (23).

Der größte Teil des Glykogens ist bei Menschen im Skelettmuskel (ca. 500 g) und in der Leber gespeichert (ca. 100 g), wobei der unterschiedliche Anteil in der Gewichtsverteilung beider Organe begründet liegt (24). Ausdauersport führt zu einer markanten Erhöhung der Glykogenspeicherkapazität im Skelettmuskel, während körperliche Inaktivität zu einer Reduktion der Glykogenspeicher führt (24). Für den Skelettmuskel ist Glykogen die primäre Kohlenhydratquelle, wobei dessen Abbaurate proportional zur Belastungsintensität ist. Eine Erhöhung der Glykogenolyse bei Ausdauersports wird durch eine Aktivierung der Glykogenphosphorylase realisiert (17). Während eines sehr kraftaufwendigen oder lang andauernden Ausdauersports wird das Glykogen sehr rasch abgebaut, wobei die Wiederauffüllung der Glykogenspeicher ca. 24 bis 48 Stunden benötigt (17). Diese Zeitspanne kann durch eine kohlenhydratreiche Nahrungszufuhr beeinflusst werden und somit den sogenannten „Superkompensationseffekt“ aus-

lösen (17). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Mechanismen für die Regulation der Glukoseaufnahme und Glykogenspeicherung eine frühzeitige Antwort des Skelettmuskels auf eine akute Ausdauerbelastung darstellen (25, 26).

Auch die IMTG stellen eine wichtige Energiequelle während eines moderaten und lang andauernden Ausdauersports dar. Nach einer solchen Belastung sind die IMTGs vor allem in ST-Typ 1 Muskelfasern um ca. 60 % erniedrigt (27). Der IMTG Abbau wird durch die Hormon-sensitive Lipase (HSL) und die Adipozyten-Triglyzerid-Lipase (ATGL) kontrolliert (28).

Nach der Beendigung eines Ausdauersports sinkt die metabolische Rate im Skelettmuskel, steigt jedoch innerhalb von 24 Stunden wieder langsam an (17). Die Erholungsphase ist dabei zum einen durch eine unmittelbare Regenerierung der Skelettmuskel Homöostase in den ersten Stunden und zum anderen durch eine längerfristige Adaptation der Muskelzellen an den Ausdauersport gekennzeichnet (17). Während der Erholungsphase nach Ausdauersport ist die Fettsäureoxidation für die Energiebereitstellung erhöht, wobei die Kohlenhydratspeicher weniger in Anspruch genommen werden (17). Die anhaltende Fettsäureoxidation im Skelettmuskel in der Erholungsphase nach Ausdauersport ist ein Schlüsselereignis in Bezug auf die Ausdauersport-induzierten Effekte im gesamten Lipid Metabolismus (17).

2.2.3.2 Molekulare Adaptationen des Skelettmuskels bei Ausdauersport

Sowohl Ausdauersport, als auch Kraftsport induzieren akut im Skelettmuskel verschiedene Signalwege bzw. intrazelluläre Kinasen wie die 5'-AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), die Proteinkinase B (Akt/PKB), die p70S6 Kinase und die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK) (17, 29). Die Aktivierung dieser Signalwege dient hauptsächlich der Energiebereitstellung und ist von der Belastungsintensität und der Gesamtleistung des Skelettmuskels abhängig (17).

Zudem erfolgen diese Aktivierungen aufgrund verschiedener Signaländerungen. So kommt es im Muskel während einer Ausdauerbelastung zu einem erhöhten Verbrauch an Adenosin-Triphosphat (ATP) und somit zu einem geänderten AMP:ATP Verhältnis. Weiterhin kommt es zu einer erhöhten Calcium Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), sowie zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einem veränderten $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$ Verhältnis (17).

Calcium spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Myosin und Aktin während einer myofibrillären Kontraktion (17). Die Kontraktions-induzierten Calcium-Oszillationen werden dabei in einzelne Signale umgewandelt, die dann CaMK modulieren. Diese sind

multifunktionale Serin/Threonin-Kinasen, die unter anderem in die Plastizität des Muskels involviert sind und diese beeinflussen (30). Die CaMK sind zudem an der Regulation des Glukose-Transports (31) und der Fettsäureaufnahme- und oxidation beteiligt (32).

Der erhöhte Ca^{2+} Influx führt auch zusammen mit dem veränderten AMP:ATP-Verhältnisses zu einer Aktivierung der AMPK (33-35). Die Intensität der Ausdauerbelastung korreliert dabei positiv mit der AMPK Aktivierung, wie in Untersuchungen am Rattenmuskel nachgewiesen wurde (36, 37). Auch im humanen Skelettmuskel konnte eine Aktivierung der AMPK nach moderatem Radfahren (38-40) und einem intensiven Sprintlauf nachgewiesen werden (41).

Der veränderte Redox-Status während einer Muskelkontraktion führt weiterhin zu einem veränderten $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$ Verhältnis, was wiederum zu einer Aktivierung von Sirtuinen führt, die für die Deacetylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind (17).

Die Akt/PKB wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert und vermittelt viele der zellulären Effekte von Insulin (29). Im Rattenmuskel wird die Akt/PKB während einer *in situ* Muskelkontraktion (42, 43) und nach einem Ausdauerlauf auf einem Laufband (44) aktiviert. Im humanen Skelettmuskel konnte ebenfalls eine Akt/PKB-Aktivierung nach einem ausdauernden Radfahren (70 % $\text{VO}_{2\text{max}}$) gezeigt werden (45). In Ratten Skelettmuskeln wird die Akt/PKB dabei akut, kurzfristig und Muskelfaser-abhängig aktiviert (44). Infolge einer Akt/PKB-Aktivierung kann es zu einer Aktivierung des mTOR Signalweges und der p70S6 Kinase kommen.

Ein Ausdauerlauf führt im Ratten Skelettmuskel auch zu einer Phosphorylierung und somit verminderten Aktivität der Glykogensynthase-Kinase (GSK) 3 (46). Im Gegensatz dazu konnte jedoch im humanen Skelettmuskel sowohl nach einer moderaten (50 % $\text{VO}_{2\text{max}}$) als auch einer intensiven Ausdauerbelastung (75 % $\text{VO}_{2\text{max}}$) eine erhöhte Glykogensynthase-Aktivität ohne eine GSK3-Deaktivierung nachgewiesen werden (47). Der Grund für diese Diskrepanz konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, wobei vermutet wird, dass dies von der Sportintensität und -dauer abhängig ist.

Weitere Signalwege, die während Sport im Skelettmuskel aktiviert werden, sind die MAPK Signalkaskaden. Diese werden in Kapitel 1.5 detailliert beschrieben.

Die Aktivierung der oben beschriebenen Signalwege führt zu unterschiedlichen metabolischen Konsequenzen.

So resultiert die Aktivierung der AMPK im Skelettmuskel in der Regulation verschiedener Signalkaskaden, die z.B. in die Glukoseaufnahme, Fettsäureoxidation, Hypertrophie und Genexpression involviert sind (33). Dabei kann die AMPK metabolische Enzyme durch direkte Phosphorylierung schnell regulieren aber auch auf transkriptioneller Ebene langfristig die Genexpression an den Energieverbrauch anpassen (48). Die GSK3 phosphoryliert und deaktiviert die

Glykogensynthese und ist in die Regulation der Signalübertragung unterschiedlicher Faktoren wie Insulin und Wachstumsfaktoren involviert (49). Die Aktivierung der p70S6 Kinase führt zu einer Erhöhung der Proteinsynthese (17).

Weiterhin führt die Aktivierung dieser Signalwege zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und einer Änderung der Genexpression. So phosphoryliert die AMPK u.a. den transkriptionellen Cofaktor PGC1 α (50) (dieser wird in Kapitel 1.4 detailliert beschrieben), verschiedene Histon-Deacetylasen (HDAC) (51), das *cAMP response-binding protein* (CREB) (52) sowie Sirtuin 1 (SIRT1) (53, 54). Die Aktivierung der CaMKs resultiert in einer verstärkten Phosphorylierung von CREB (55-57), HDACs (58, 59) und dem *Serum response factor* (SRF) (60).

Aufgrund verschiedener transkriptioneller und translationaler Prozesse kommt es somit zu einer Modulation der Genexpression. Dies betrifft Gene, die sowohl in den Metabolismus, die mitochondriale Biogenese und die Angiogenese als auch in Schutzmechanismen des Skelettmuskels während einer Ausdauerbelastung involviert sind. So führt ein akuter Ausdauersport sehr schnell zu einer erhöhten Expression von *Immediate early genes* (IEGs). Diese werden in Kapitel 1.6 detailliert beschrieben. Eine Ausdauersport-induzierte Aktivierung von *Nuclear respiratory factors* (NRF) Transkriptionsfaktoren führt zu einer erhöhten Expression von GLUT-4 und zu einer vermehrten Expression von Genen, die für Proteine der mitochondrialen respiratorischen Atmungskette kodieren (61).

Ausdauersport führt weiterhin auch zu einer vermehrten Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs), insbesondere von PPAR δ , was in einer verstärkten Fettsäureoxidation resultiert (17, 62).

Neben der akuten Antwort infolge eines Ausdauertrainings zeigt der Skelettmuskel auch langfristige Adaptationen. Die Ausdauersport-induzierten Adaptationen sind abhängig von der Trainingsart und können Muskelfaser-spezifisch auftreten (63).

Dazu gehören vor allem eine gesteigerte Verfügbarkeit von Kohlenhydraten durch eine erhöhte Kapazität der Glykogenspeicher und eine Erhöhung der Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}). Weiterhin kommt es längerfristig zu einer Muskelhypertrophie und einer Muskelfaserumschaltung (64). Bei Sprintläufern kommt es im Skelettmuskel z.B. infolge des Trainings zu einer Zunahme an Typ 2A Muskelfasern. Des Weiteren wird auch das Volumen des SR erhöht, um die vermehrte Ca^{2+} Ausschüttung zu erleichtern (64). Insgesamt sind diese Adaptationen relevant für den arbeitenden Muskel zum einen für eine verbesserte Substratzufuhr, zum anderen aber auch für eine Erhöhung der mitochondrialen respiratorischen Kapazität und einer verbesserten Kontraktionsfunktion des Skelettmuskels (17).

Darüber hinaus führt ein längerfristiges Training auch zu Protektionsmechanismen im Skelettmuskel, um diesen vor einer potentiellen Schädigung und Überbeanspruchung zu schützen. Es wird vermutet, dass der Skelettmuskel darauf mit der Induktion von bestimmten Hitzeschockproteinen (HSPs) wie HSP60, HSP70 oder HSP27 reagiert (63, 65-68). Aufgrund der vermehrten Bildung von ROS kommt es nach einem Ausdauertraining im Skelettmuskel durch die Aktivierung ROS-abhängiger Signalwege zusätzlich zu einer gesteigerten Aktivität antioxidativer Enzyme wie SOD2, Glutathion Peroxidase (GPX) und γ -Glutamylcystein Synthetase (GCS) (69, 70), was letztendlich auch zu einer Erhöhung der physischen Kapazität führt (71).

2.3 Die Rolle der Leber während einer 60-minütigen Ausdauerbelastung

2.3.1 Die Rolle der Leber im Glukosestoffwechsel

Die Leber ist das zentrale Organ für die Aufrechterhaltung der Fett- und Glukosehomöostase und muss besonders in Zeiten verminderter Energiezufuhr den Organismus mit ausreichend Glukose versorgen (72, 73). Dies geschieht hauptsächlich über die Glykogenolyse und die Glukoneogenese (74), wobei die hepatische Glukoseabgabe zu 75 % durch den Abbau von Glykogen und zu 25 % durch die Glukoneogenese (primär durch die Umwandlung von Laktat und Alanin in Glukose) realisiert wird (75). In humanen Studien konnte gezeigt werden, dass die niedrigen Plasma Insulinspiegel im postabsorptiven Stadium zusammen mit der Freisetzung von Glucagon für die Stimulation der hepatischen Glykogenolyse und Glukoneogenese notwendig sind. Auch eine Mobilisierung von Aminosäuren und Fettsäuren ist für die Initiierung der Glukoneogenese essentiell.

Glukose ist ein entscheidender Energielieferant, der einer starken Kontrolle zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase unterliegt. Zu hohe oder zu niedrige Glukosespiegel können zu der Entstehung eines Diabetes oder zu Hypoglykämie führen (76).

2.3.1.1 Die Regulation der Glukoneogenese

Die Kontrolle der Glukoneogenese erfolgt über transkriptionelle und translationale Mechanismen. Zudem erfolgt eine posttranslationale Kontrolle über die Substratverfügbarkeit und die allosterische Regulation von Enzymaktivitäten. Die transkriptionelle Kontrolle wird dagegen mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren durch die Aktivierung oder Repression von Genen, die für glukoneogenetische Enzyme kodieren, erzielt (77). Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren und ihre Aktivitäten werden u.a. durch Insulin und Glucagon kontrolliert. Somit unterliegt die Kontrolle der Glukoneogenese einer hormonellen Regulation (77).

Einer der Transkriptionsfaktoren für die transkriptionelle Kontrolle ist CREB. CREB ist ein helix-loop-helix Leucin Zipper Transkriptionsfaktor, der ubiquitär während einer anhaltenden Nahrungsrestriktion exprimiert wird (78). Während einer Hungerphase kommt es in den pankreatischen α -Zellen infolge des niedrigen Glukosespiegels zu einer vermehrten Sekretion von Glucagon (79). Dieses bindet an seinen trimere G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) und verursacht somit einen GTP/GDP Austausch, der die membrangebundene Adenylatcyclase stimuliert, die daraufhin ATP in cAMP konvertiert (79). Der darauffolgende Anstieg von cAMP stimuliert die katalytische und regulatorische Untereinheit der Proteinkinase-A (PKA), welche anschließend in den Nukleus wandert. Dort phosphoryliert sie CREB an Ser133 und konvertiert es somit in seine aktive Form (79). Nachfolgend kann phospho-CREB an das *cAMP-responsive-element* (CRE) im Promotor seiner Zielgene binden. Für die maximale Aktivierung seiner Zielgene benötigt CREB die Bindung seines Coaktivators CREB-regulierter Transkriptionsfaktor 2 (CRTC2/TORC2). CRTC2/TORC2 ist im Nukleus lokalisiert und ein Schlüsselregulator der Glukosehomöostase während einer Nahrungsrestriktion (80).

Da die Glukoneogenese keine einfache Umkehrung der Glykolyse ist und letztere 3 irreversible Schritte in ihrem Prozess beinhaltet, werden für den Ablauf 4 zusätzliche Enzyme benötigt, die diese Schritte umgehen können. Der initiale Schritt der Glukoneogenese ist die Carboxylierung von Pyruvat in Oxalacetat, der durch die Pyruvatcarboxylase (PC) katalysiert wird (81). Anschließend katalysiert die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) die GTP-abhängige Decarboxylierung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat (82). Im zweiten irreversiblen Schritt katalysiert die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBP) die Mg^{2+} -abhängige Hydrolyse von Fruktose-1,6-Bisphosphat zu Fruktose-6-Phosphat (79). Der letzte und terminale Schritt der Glukoneogenese wird durch die Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) realisiert, die die Mg^{2+} -abhängige Hydrolyse von Glukose-6-Phosphat zu Glukose und anorganischem Phosphat katalysiert (79). Die dabei entstandene Glukose wird anschließend über den Glukosetransporter 2 (GLUT-2) in die Blutzirkulation abgegeben (79). Die G6Pase ist vor allem in der Leber und der Niere, weniger aber auch im Dünndarm exprimiert (79). Sie wird allein durch transkriptionelle Mechanismen, nicht aber durch posttranslationale Modifikationen reguliert.

2.3.2 Die Rolle der Leber im Lipidstoffwechsel

Fettsäuren sind neben den Kohlenhydraten die wichtigsten Energielieferanten, wobei Triglyzeride die häufigste Speicherform der Fettsäuren sind (83). Der Triglyzeridgehalt in den Hepato-

zyten wird einerseits durch die Aktivität zellulärer Moleküle, die die hepatische Fettsäureaufnahme, -synthese und -esterifizierung erleichtern und andererseits durch die hepatische Fettsäureoxidation und den Triglyzeridexport reguliert (83). Freie Fettsäuren (FFAs) können durch die Hydrolyse von Lipiden durch Lipasen oder durch die Hydrolyse von Acyl-CoA durch Thioesterasen gebildet werden (83). Die Leber nimmt die FFA aus dem Blut im Verhältnis zu ihrer Konzentration auf (83).

Fettsäuren spielen auch bei der Regulation der Genexpression von Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Der hepatische Lipidmetabolismus ist ein koordinierter Prozess, in dem viele Signalwege durch nukleäre Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Er unterliegt einer strengen Kontrolle durch die intrazellulären FFA-Spiegel aber auch durch andere metabolische und hormonelle Faktoren, wie Kohlenhydrate und Insulin (83). Zu den regulierenden Transkriptionsfaktoren gehören *Sterol-regulatory element binding proteins* (SREBPs), *CCAAT-enhancer-binding-proteins* (C/EBPs) sowie Mitglieder der NRF Familie (84).

2.3.3 Die Leber und Nahrungsrestriktion

2.3.3.1 Die Folgen einer Nahrungsrestriktion auf den Organismus

Die Glukosehomöostase ist während Nahrungszufuhr und Nahrungsrestriktion einerseits durch die Energieverfügbarkeit und andererseits durch den Energiebedarf reguliert (79). Während einer längeren Nahrungsrestriktion können Fett und Protein aus Fettgewebe (WAT) und Muskel abgebaut und mobilisiert werden, um die anderen Organe mit Energie zu beliefern (79).

Da vor allem das Gehirn auf eine kontinuierliche Menge an Glukose angewiesen ist, beginnt die Leber von einem postprandialen in ein postabsorptives Stadium umzuschalten (74). Zunächst baut sie Glykogen ab um die Glukosehomöostase des Körpers aufrecht zu erhalten. Jedoch sind die Glykogenspeicher der menschlichen Leber begrenzt. So kommt es, dass während einer fortdauernden kontinuierlichen Hungerphase die hepatische Glykogenolyse graduell abnimmt und innerhalb von 48 Stunden eine völlige Entleerung der hepatischen Glykogenspeicher verursacht (74). Um die Blutglukosehomöostase aufrecht zu erhalten, erfordert die schnelle Abnahme der hepatischen Glykogenspeicher in der postabsorptiven und zeitigen Hungerphase die Umstellung der Leber auf die Glukoneogenese (74). Bei anhaltender Nahrungsrestriktion ist die Glukoneogenese die primäre Glukosequelle, das heißt die Leber synthetisiert Glukose aus Nicht-Kohlenhydraten wie Glycerin, Laktat und Alanin (74, 85). Mit immer länger fortschreitender Nahrungsrestriktion nimmt der Proteinkatabolismus im Muskel und die Ami-

nosäureaufnahme in der Leber ab, was letztendlich auch in einer Abnahme der endogenen Glukoseproduktion resultiert (86). Gleichzeitig steigt der Katabolismus im Fettgewebe und die Bildung von Ketonkörpern in der Leber (86). Diese Feinregulation zwischen Energieverfügbarkeit und Energiebereitstellung sowie die Fähigkeit des Organismus, Kohlenhydrate und Fette zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase zu nutzen dient im hohen Maß der Anpassung des Organismus an metabolische Veränderungen und wird auch metabolische Flexibilität genannt (85, 87).

2.3.3.2 Molekulare Regulationsmechanismen während einer Nahrungsrestriktion: Bedeutung von PDK4, IGFBP1, und FGF21

Eines der wichtigsten Enzyme, die die metabolische Flexibilität ermöglichen, ist der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) (85). Dieser Enzymkomplex kontrolliert die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA und ist ein wichtiger Schalter zwischen Fettsäuremetabolismus, Glukosemetabolismus und Citratzyklus.

Während einer anhaltenden Nahrungsrestriktion ist die Expression des Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isozyms 4 (PDK4) in der Leber und im Muskel erhöht (88). Dieses Enzym hemmt den PDC und verhindert somit die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA. Dies ermöglicht nachfolgend eine weitere intrahepatische Umwandlung von Pyruvat, Laktat und Alanin in Glukose (88). Tao *et al.* konnten zeigen, dass die PDK4 Aktivität in der Leber von diabetischen Patienten signifikant erhöht ist (89). Somit ließe sich auch die erhöhte Glukoneogenese-Aktivität bei Diabetes Patienten erklären (89). Eine Hemmung von PDK4 führt dagegen zu größerer Aktivität von PDC und erhöhter Glukose Oxidation (85).

Ein weiteres wichtiges Protein für die Glukoseregulation und die metabolische Homöostase ist das IGF-Bindeprotein-1 (IGFBP1) (90, 91). IGF-Bindeproteine binden mit hoher Affinität an insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) und modulieren somit deren biologische Aktivität (92, 93). Die Leber sekretiert IGFBP1 vor allem während einer Nahrungsrestriktion (91), aber auch während einer Ausdauerbelastung. Während einer Hypoglykämie ist ein Anstieg von IGFBP1 für die metabolische Wirkung von IGF-1 und damit auch für die Regulation der Glukosehomöostase wichtig. Insulin hemmt die Genexpression von IGFBP1 und damit die Sekretion von IGFBP1 in das Serum (93, 94), während Cortisol die IGFBP1 Expression stimuliert (93). Zudem verbessert IGFBP1 die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz, erniedrigt den Blutdruck, verstärkt die Stickstoff Bildung in Gefäßen und reduziert das Arteriosklerose Risiko (91).

Ein weiterer bekannter Regulationsfaktor während einer Nahrungsrestriktion ist der *Fibroblast-growth-factor 21* (FGF21). FGF21 besteht aus 209 Aminosäuren. Es besitzt wichtige Funktionen in der Regulation von endokrinen Geweben und der Modulation verschiedener Stoffwechselprozesse (95). FGF21 wird vor allem in der Leber (95, 96), aber auch im Skelettmuskel (97), pankreatischen β -Zellen (98) und im Fettgewebe (99) exprimiert. FGF21-*Knock-out* (KO) Mäuse zeigen eine reduzierte hepatische Glukoneogenese und Ketogenese Aktivität (100). In *ob/ob* Mäusen führt eine FGF21 Behandlung zu einem gesteigerten Energieverbrauch und einem Gewichtsverlust (101). Andererseits sind bei T2DM Patienten die Nüchtern-FGF21 Werte signifikant erhöht und korrelieren negativ mit den Nüchtern-Blutglukosewerten (102). Für ihre Aktivierung benötigen die FGFs spezifische FGF-Rezeptoren, von denen bis heute mindestens 5 verschiedene identifiziert werden konnten (95, 103-105). Kharitonov *et al.* konnten zeigen, dass FGFR1 und FGFR2 die für die Wirkung von FGF21 verantwortlichen Rezeptoren in Maus-Adipozyten sind (95). Nach Bindung an seinen Rezeptor aktiviert FGF21 die ERK1/2 MAPK und die Akt/PKB Kinase sowohl in der Leber als auch im Skelettmuskel von Mäusen als auch in Ratten-Inseln und INS-1E Zellen (97, 98).

Für die Interaktion von FGF21 mit einem FGFR ist der Co-Rezeptor β -Klotho notwendig, wobei es zu der Formation eines FGF21- β -Klotho-FGFR Komplexes kommt (106-108).

Die Expression von humanem FGF21 wird sowohl durch Nahrungsrestriktion als auch durch eine Nahrungsaufnahme reguliert (109). In der humanen Leber wird FGF21 bei einer Nahrungsrestriktion durch PPAR α und PKA-abhängige Signalwege vermehrt exprimiert (109). Auch Glukose stimuliert die humane FGF21 Expression in der Leber durch eine Aktivierung des *Carbohydrate response element-binding Proteins* (ChREBP) (110). Im humanen Fettgewebe wird die FGF21 Genexpression koordinativ durch PPAR γ und ChREBP reguliert (109). Potthoff *et al.* konnten zeigen, dass FGF21 die hepatische PGC1 α Expression bei Mäusen induziert, wobei FGF21 die Aktivität von PGC1 α auch durch posttranslationale Modifikationen regulieren kann (100). Dies konnte nicht zuletzt dadurch gezeigt werden, dass die nach einer 24-stündigen Nahrungsrestriktion induzierte Expression von PGC1 α und seines Zielgens G6Pase in der Leber von FGF21-KO Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen signifikant erniedrigt war (100).

FGF21 hat gemeinsam mit Insulin auch eine große Bedeutung für den Fettstoffwechsel. Beide verursachen eine Glucagon Reduktion, reduzieren die Triglyzeridspiegel und führen zu einer Zunahme des HDL Cholesterols (102). In der Leber von Mäusen reduziert Insulin die PGC1 α Expression (111) und induziert die Lipogenese durch vermehrte Expression des SREBP1C

(112), während FGF21 in humanen Hepatozyten die Lipogenese unterdrückt (113) und eine verstärkte Fettsäureoxidation fördert (114).

2.3.4 Die Leber und Sport

Die während der Tübinger Lebensstilinterventionsstudie durchgeführte Magnetresonanztomographie-Analyse (H-MRS) zeigte nach 9-monatiger Kalorienrestriktion und vermehrter körperlicher Bewegung eine 32 %ige Leberfett Reduktion, jedoch nur eine 13 %ige Abnahme des viszeralen Fetts und eine nur mäßige Abnahme des Gesamt-Körper- und subkutanen Fetts. Die Intervention bewirkte zudem eine Abnahme der Nüchtern-Blutzuckerwerte sowie eine Verbesserung der hepatischen Insulinsensitivität (11, 115). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur der Skelettmuskel, sondern auch die Leber durch Ausdauersport beeinflusst wird (116, 117).

Während einer Ausdauerbelastung wird die erhöhte Glukoseproduktion in der Leber größtenteils hormonell durch Insulin und Glucagon geregelt, wobei aber auch Catecholamine und Glukokortikoide hierauf einen großen Einfluss haben. Über die molekularen Vorgänge, die bei Ausdauersport in der menschlichen Leber ablaufen, ist wenig bekannt, es gibt allerdings einige Untersuchungen bei Mäusen und Ratten zu dieser Fragestellung (116-122).

In der Leber wie auch im Skelettmuskel wird während einer Ausdauerbelastung und dem daraus folgenden AMP:ATP Verhältnis die AMPK aktiviert (123, 124). Die Aktivierung der AMPK erfolgt einerseits allosterisch durch einen Anstieg der AMP-Konzentration, andererseits aber auch kovalent durch die Phosphorylierung eines Threonin-Restes (Thr172) durch die AMPKK/LKB1 Kinase (125, 126). Weiterhin wird die AMPK in der Leber während einer Ausdauerbelastung auch durch einen Glucagon- und Catecholamin induzierten cAMP-Anstieg über die PKA aktiviert (125, 127).

Ein 60-minütiger Ausdauerlauf aktiviert in der Leber von Mäusen auch den MAPK Signalweg (siehe Kapitel 2.5).

Ebenfalls konnte nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf in der Leber von Mäusen eine Aktivierung des p53 Signalweges aufgezeigt werden. Dies ergab sich sowohl durch eine verstärkte Phosphorylierung des p53 Proteins in der Leber als auch durch eine Zunahme der Expression des *p53 inducible nuclear protein* (TP53INP1) (116). Der p53 Signalweg wird u.a. infolge von metabolischem Stress, Hypoxie oder DNA-Schäden aktiviert (128). Die Regulation des p53 Signalweges unterliegt der Kontrolle eines Ubiquitin-proteasomalen Abbaus. Diese erfolgt über

eine Interaktion von p53 mit der E3-Ubiquitin-Protein Ligase (MDM2). In humanen Hepatozyten (HepG2) führt eine Phosphorylierung von MDM2 an Ser166 zu seiner Aktivierung und resultiert somit in einem verstärkten Abbau von p53, wobei die Phosphorylierung durch die ERK1/2 MAPK und die Akt/PKB Kinase kontrolliert wird (129). In der Erholungsphase nach dem Ausdauerlauf konnte in der Leber eine Zunahme der Phosphorylierung von MDM2 und von Ser473 der Akt/PKB Kinase gezeigt werden (130).

Ebenso wurde die IL-6-abhängige Aktivierung des JAK/STAT-3 Signalweges in der Leber von Ratten nach einem erschöpfenden Ausdauerlauf detektiert (121). Dies zeigte sich in einer Zunahme der Phosphorylierung des *Signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3 und des C/EPB β (121).

Nach einem Ausdauerlauf auf dem Laufband ist die hepatische Expression lipogenetischer Enzyme bei Ratten und Mäusen reduziert (117, 131, 132) und gleichzeitig die Expression glukoneogenetischer Enzyme, wie G6Pase und PEPCK induziert (117, 121, 133). Weiterhin wurde bei Mäusen auch eine erhöhte Genexpression metabolisch relevanter Gene, wie IGFBP1, Insulin-Rezeptor-Substrat 2 (IRS-2), *Angiopoietin-like 4* (ANGPL4) und Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) nachgewiesen (116). Welche Bedeutung hierbei die Aktivierung der beschriebenen Signalwege hat, ist noch nicht geklärt.

Die Aktivierung des p53 Signalweges in der Leber könnte eine Rolle bei der verstärkten Genexpression des *Growth arrest and DNA-damage inducible γ* (GADD45 γ), der Serum- und Glukokortikoid-regulierten Kinase 1 (SGK1) sowie von IGFBP1 spielen, die beschriebene Zielgene des p53 Signalweges sind und nach Ausdauersport vermehrt in der Leber exprimiert werden (116).

Nicht nur ein akuter Ausdauerlauf, sondern auch ein langfristiges Ausdauertraining führt in der Leber zu einer Veränderung der Genexpression. So konnten Zhang *et al.* bei Ratten zeigen, dass nach einem langfristigen Ausdauertraining die Expression von PPAR α und auch seiner Zielgene wie dem nukleären Hepatozyten Faktor 4 (HNF4), der Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT-1) und der Katalase (CAT) zunimmt (120).

Ein 4-wöchiges Ausdauertraining auf einem Laufband führt bei Ratten zu einer vermehrten Expression der inhibitorischen κ B Kinase (IKK) sowie von STAT-3 in der Leber (118). Nach einem 10-wöchigen Ausdauertraining auf einem Laufband war ebenfalls bei Ratten die hepatische Expression antioxidativer Enzyme wie der Superoxiddismutase (SOD) und der CAT erhöht (122). In einem 8-wöchigen Ausdauertraining Programm auf einem Laufband mit Ratten konnte eine Erhöhung an reduziertem Glutathion in der Leber festgestellt werden (134). Eine

weitere Studie zeigte, dass ein moderates Ausdauertraining die altersbedingte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verhindert (135).

Diese Ergebnisse belegen, dass auch die Leber langfristig auf den Ausdauersport-induzierten oxidativen Stress reagiert (117).

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Leber ein wichtiges funktionelles Organ während einer Ausdauerbelastung ist und möglicherweise in viele der bekannten gesundheitlichen Aspekte körperlicher Aktivität wie einer verbesserten Glukosehomöostase und Insulinsensitivität involviert ist (116).

2.4 Der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Coactivator 1-alpha (PGC1 α)

PGC1 α war der erste identifizierte transkriptionelle Coaktivator des Peroxisome-Proliferator-aktivierten Rezeptors gamma (PPAR γ) (136). Es ist im braunen Fettgewebe (BAT), im Herz und im Skelettmuskel, im Gehirn, in der Niere, in der Leber und im weißen Fettgewebe (WAT) exprimiert (137). PGC1 α besteht aus insgesamt 4 Domänen: Einer Transaktivierungsdomäne mit einem Erkennungsmotiv für nukleäre Hormonrezeptoren, einer Repressionsdomäne mit regulatorischen Phosphorylierungsstellen, einer RNA-Prozessierungsdomäne und einer RNA-Polymerase Interaktionsdomäne (138). PGC1 α reguliert seine Promotoraktivität selbst durch einen positiven Autoregulationsloop, was vermutlich mit einer Interaktion des Transkriptionsfaktors *Myocyte enhancer factor 2* (MEF2) einhergeht (139). Die Expression und Aktivität von PGC1 α wird sowohl durch Hormone wie Insulin, Glucagon und Glukokortikoide (140) als auch durch den zellulären Energiestatus und die Aktivierung der AMPK und mTOR reguliert (111, 141). Neben der Regulation seiner Expressionslevel unterliegt PGC1 α auch einer Steuerung durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen und Methylierungen sowie durch Interaktionen mit anderen Proteinen (142). So wird die Regulation der transkriptionellen Aktivität von PGC1 α auch durch eine reversible Acetylierung und Deacetylierung realisiert. Die Histon-Acetyltransferasen CBP/p300 und GCN5 acetylieren dabei PGC1 α an verschiedenen Lysin Resten und regulieren somit negativ dessen transkriptionelle Aktivität (142, 143), während die HDAC SIRT1 eine vermehrte Transkription von PGC1 α verursacht (142).

2.4.1 Die Rolle von PGC1 α im Skelettmuskel

PGC1 α spielt im Skelettmuskel unter anderem eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von oxidativen ST-Typ 1 Muskelfasern, der mitochondrialen Biogenese und der

Bildung neuer oxidativer Muskelfasern aus glykolytischen Muskelfasern (Muskelfaserumschaltung) (144-146). Dabei besitzen ST-Typ 1 Muskelfasern einen höheren PGC1 α Gehalt und sind besser vor einer Muskelatrophie geschützt (147). Die Muskel-spezifische Überexpression von PGC1 α in transgenen Mäusen bewirkt eine Verstärkung der mitochondrialen Biogenese und eine vermehrte Bildung oxidativer ST-Typ 1 Muskelfasern (148).

Während einer Ausdauerbelastung wird PGC1 α aufgrund des höheren Glykogenverbrauchs im Skelettmuskel durch die AMPK aktiviert, indem eine Phosphorylierung an den Resten Thr177 und Ser538 erfolgt (50), die schließlich in einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von PGC1 α resultiert (48).

Des Weiteren wird PGC1 α auch durch eine erhöhte Ca²⁺ Konzentration über die Aktivierung der CaMKIV und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB-1 (149) sowie während einer Ausdauerbelastung im Skelettmuskel auch durch die Calcineurin/MEF2 Signalkaskade aktiviert (150).

Auch die p38 MAPK/ATF2 Signalkaskade spielt eine Rolle bei der Aktivierung von PGC1 α im Skelettmuskel (151).

2.4.2 Die Rolle von PGC1 α in der Leber

In der Leber spielt der Coaktivator PGC1 α während einer Nahrungsrestriktion eine wichtige Rolle (111, 140, 141, 152), da er für die Regulation des Metabolismus und des Energiehaushaltes notwendig ist (144). Dabei interagiert PGC1 α mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. dem Glukokortikoidrezeptor (GR), dem nukleären Hepatozyten Faktor alpha (HNF α) sowie dem *Forkhead-box protein O1* (FOXO1) (111, 140). PGC1 α reguliert durch eine Bindung und Modulation dieser Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen, die in unterschiedliche metabolische Signalwege involviert sind, wie beispielsweise in die Fettsäureoxidation, Glukoneogenese, Glykolyse und Fettsäuresynthese (153).

PGC1 α kann dabei von der p38 MAPK, der AMPK und der Akt/PKB Kinase phosphoryliert werden (50, 142, 154). Ein postprandialer Anstieg von Insulin führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Akt/PKB Signaltransduktionskaskade. Li *et al.* konnten in der Leber von Mäusen zeigen, dass die Akt/PKB Kinase PGC1 α an Ser570 phosphoryliert und somit in seine transkriptionelle inaktive Form konvertiert und nachfolgend die Glukoneogenese inhibiert, wobei diese Inhibition wahrscheinlich durch eine fehlende Interaktion von PGC1 α mit dem Transkriptionsfaktor HNF4 α verursacht wird (154, 155). Eine Nahrungsrestriktion induziert die PGC1 α Expression in Maus Hepatozyten und führt deshalb zu einer Erhöhung der PEPCCK und

G6Pase Expression. Somit ist PGC1 α für die Regulation der hepatischen Glukoseproduktion von großer Bedeutung (111). Der Anstieg von PGC1 α korreliert dabei mit einer erhöhten Aktivität von SIRT1, die durch hohe Konzentrationen von NAD⁺ und Pyruvat stimuliert wird (156, 157). Rodgers *et al.* konnten zeigen, dass eine Herunterregulierung des SIRT1 Gens in der Leber von Mäusen eine reduzierte Expression glukoneogener Gene verursacht und die Glukosehomöostase verschlechtert (158). Weiterhin konnten Erion *et al.* in T2DM Ratten zeigen, dass eine Herunterregulation von SIRT1 in der Leber die bei einer T2DM Erkrankung auftretende übermäßig induzierte hepatische Glukoneogenese vermindert (159). Aus diesem Grund nimmt SIRT1 eine kritische Rolle in der Regulation von PGC1 α während einer Nahrungsrestriktion und der Entstehung eines T2DM ein (79).

Auch Ausdauersport erhöht die Expression von PGC1 α in der Leber (116), jedoch gibt es hierbei unterschiedliche Erkenntnisse über dessen Bedeutung. Eine akute Ausdauerbelastung verursacht zwar eine Steigerung der Expression glykogenolytischer und glukoneogener Enzyme und ein Ausdauertraining verbessert langfristig auch die glukoneogene Kapazität, jedoch ist nach neueren Erkenntnissen hierin nicht PGC1 α involviert (152). Demnach soll PGC1 α während Ausdauertraining eine wichtigere Rolle bei der Regulation der oxidativen Kapazität der Leber spielen (152).

2.5 Die Bedeutung des MAPK Signalweges bei Ausdauersport in Muskel und Leber

2.5.1 Der MAPK Signalweg

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind Serin/Threoninkinasen, die extrazelluläre Stimuli in eine Vielzahl von zellulären Antworten umwandeln können (160). Sie gehören zu den am längsten bekannten Signaltransduktionswegen und sind in viele biologische Prozesse involviert (160, 161). Alle eukaryotischen Zellen besitzen verschiedene MAPK, welche unter anderem in die Regulation der Genexpression, der Mitose, des Metabolismus, der Zellmotilität, des Überlebens, der Apoptose und der Zelldifferenzierung involviert sind (160). Hierbei stellen die MAPK Signalwege eine wichtige Verbindung zwischen der externen Stimulation von Rezeptoren an der Zellmembran durch beispielsweise Wachstumsfaktoren und einer darauffolgenden Änderung der Genexpression im Nukleus her.

Die MAPK bestehen aus den extrazellulären Kinasen ERK1/2, den c-Jun-N-terminalen Kinasen 1/2/3 (JNK1/2/3), den p38 Isoformen (α , β , γ und δ Isoform) und der ERK5 Kinase (160, 162). Ferner wurden atypische MAPK wie die ERK3/4, die ERK7 und die *Nemo-like-kinase* (NLK) identifiziert (160). Jede Gruppe der MAPK ist aus drei evolutionär konservierten und

sequentiell wirkenden Kinasen zusammengesetzt: einer MAPK, einer MAPK Kinase, (MAPKK) und einer MAPKK Kinase (MAPKKK) (160). Die MAPKKK sind Serin/Threonin Kinasen, die häufig durch Phosphorylierung oder aber durch Interaktion mit kleinen GTP-Bindeproteinen der Ras/Rho-Familie infolge extrazellulärer Stimuli aktiviert werden (160).

Eine Phosphorylierung und Aktivierung der MAPKKK führt zu einer Aktivierung der MAPKK, die dann die MAPK ebenfalls durch Phosphorylierung an bestimmten Threonin und Tyrosin Resten in einem konservierten Thr-X-Tyr Motiv aktivieren (160, 163). Infolge einer MAPK Aktivierung werden deren Zielsubstrate, die durch einen bestimmten Prolin-Rest in der Substratregion von den MAPK erkannt werden, durch diese an Serin- und Threonin Resten phosphoryliert. (160, 163). Die ERK Kaskade wird vor allem durch Wachstumsfaktoren und Mitogene aktiviert, während die JNK und die p38 MAPK darüber hinaus auch infolge von zellulärem Stress wie UV-Strahlung, osmotischen Schock, Hypoxie und durch Zytokine induziert werden (164, 165).

Die Aktivierung der MAPK führt über die Phosphorylierung von Substraten wie Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren zur Regulation von Zelldifferenzierung und Zellwachstum, Apoptose, Inflammation und beeinflusst auch den Kohlenhydrat- und Fettmetabolismus (162).

2.5.1.1 Der p44/p42 MAPK (ERK1/2) Signalweg

ERK1 und ERK2 wurden erstmals in den frühen 1990er Jahren charakterisiert und weisen eine 83%ige Aminosäureidentität auf (160).

Das ERK1/2 Modul von Säugetieren besteht insbesondere aus den MAPKKKs A-Raf, B-Raf und Raf-1, den MAPKKs MEK1 und MEK2 und den MAPK ERK1 und ERK2 (160).

Das ERK1/2 Modul wird durch zellmembranständige Rezeptoren wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) aktiviert (160), welche wiederum durch Wachstumsfaktoren oder GPCRs aktiviert werden. Die Liganden induzierte Rezeptordimerisierung verursacht eine Aktivierung und Autophosphorylierung des Rezeptors an Tyrosin-Resten in seiner intrazellulären Domäne, die dann wiederum als spezifische Bindungsstellen für Proteine dienen, die eine Src-homologe Domäne 2 (SH2) oder eine Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB) wie *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) besitzen (160). Anschließend erfolgt die Aktivierung des G-Proteins Ras über einen Guanin Nukleotid Austauschfaktor. Die am besten charakterisierte Ras Aktivierung an der Plasma Membran wird durch *Son of sevenless* (Sos), einem Guanin Nukleotid Austauschfaktor, realisiert. Dieser wird aus dem Zytosol zur Plasmamembran durch eine Interaktion mit Grb2 rekrutiert, wodurch wiederum der GDP-GTP Austausch stimuliert wird, der für eine vollständige Ras Aktivierung notwendig ist (160). Durch den Nukleotid Austausch ist Ras in der

Lage, direkt mit seinen Zielaktivatoren zu interagieren (160). In seiner GTP-gebundenen Form rekrutiert Ras anschließend die Raf Kinasen (ARAF, BRAF und CRAF) an die Plasmamembran, die daraufhin das ERK1/2 Modul aktivieren (160, 166). GPCRs können das ERK1/2 Modul auch direkt durch Erhöhung von Raf-1 aktivieren, wobei dieser Mechanismus abhängig von der Klasse des G-Proteins, dem Zelltyp und der Expression von Effektormolekülen zu sein scheint (167). Die aktivierte Raf Kinase bindet und phosphoryliert anschließend die dualspezifische MEK1/2 Kinase, die dann im weiteren Verlauf die ERK1/2 Kinase an einem konservierten Thr-Glu-Tyr Motiv in seinem Aktivierungsloop phosphoryliert (160). Nach seiner Aktivierung kann ERK1/2 verschiedene Proteine im Zytoplasma und im Nukleus phosphorylieren. Seit einiger Zeit sind eine Reihe von MEK1/2 Inhibitoren bekannt wie z.B. PD98059 und U0126 (160). Diese Inhibitoren interagieren stärker mit der inaktiven und unphosphorylierten Form der MEK1/2 Kinase als mit der phosphorylierten Form und verhindern entweder deren Phosphorylierung oder Konformationsänderung, die für die Aktivierung der entsprechenden Kinasen notwendig ist (160). MEK1/2 Inhibitoren werden mittlerweile in klinischen Studien als Wirkstoffe gegen Krebs getestet (166).

Das ERK1/2 Modul ist unter anderem in die Kontrolle der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und des Überlebens involviert (160, 165, 168). Nach seiner Translokation in den Nukleus aktiviert es unter anderem die Mitogen-und Stress-aktivierte Kinase 1 und 2 (MSK) sowie die p90 ribosomale S6 Kinase (RSK2) (162) und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie Elk1, CREB und Fos (169).

2.5.1.2 Der JNK MAPK Signalweg

Derzeit sind drei Isoformen der c-Jun-N-terminalen Kinase oder auch Stress-aktivierten Proteinkinase (JNK/SAPK) bekannt (JNK1, JNK2 und JNK3), wobei JNK1 und JNK2 ubiquitär und JNK3 hauptsächlich in Gehirn, Herz und Testis vorkommen (165, 170). JNK Isoformen werden infolge verschiedener Formen von Zellstress wie Hitzeschock, UV-Strahlung, oxidativem Stress, DNA-schädigenden Stoffen, DNA- und Proteinsynthese Inhibitoren, weniger auch durch Wachstumsfaktoren und durch einige GPCRs aktiviert (160, 171). Eine Hyperaktivierung der JNK MAPK wurde bereits bei vielen Krankheiten wie Krebs, inflammatorischen und neurodegenerativen Krankheiten beobachtet (172).

Die Aktivierung der JNK Isoformen erfordert eine duale Phosphorylierung an Tyr und Thr Resten innerhalb eines konservierten Thr-Pro-Tyr Motivs in ihrem Aktivierungsloop (160). Die für die Aktivierung der JNK MAPK erforderliche Phosphorylierung erfolgt durch die dualspezifischen MAPKK MKK4 und MKK7 an den Resten Thr183 und Tyr185 (173). Es konnte

bereits gezeigt werden, dass MKK4, nicht aber MKK7 auch die p38 MAPK aktivieren kann (170). Beide MAPKK können die JNK Isoformen aktivieren, werden selbst jedoch durch unterschiedliche Substrate induziert. Die MKK7 Proteinkinase wird hauptsächlich durch Zytokine aktiviert (TNF, IL-1), während die MKK4 Proteinkinase vorrangig durch Umgebungsstress aktiviert wird (170). Wie auch ERK1/2 transloziert zumindest ein Teil der aktivierten JNKs nach ihrer Stimulation aus dem Cytosol in den Nukleus (160). C-Jun war der erste identifizierte Transkriptionsfaktor, der durch die JNK MAPK reguliert wird (174). JNK phosphoryliert c-Jun an Ser63 und Ser73 innerhalb seiner Aktivierungsdomäne und verstärkt dadurch die c-Jun-abhängige Transkription (175). Des Weiteren fördert JNK durch die Aktivierung von c-Jun die Bildung des AP-1 Komplexes und die Transkription von Genen, die eine AP-1 Bindeseite besitzen (160).

Aufgrund des Einflusses der JNK MAPK auf verschiedene inflammatorische und neurodegenerative Krankheiten oder Krebserkrankungen ist es denkbar, dass JNK Inhibitoren, von denen derzeit mehrere bekannt sind, zu deren Behandlung eingesetzt werden könnten (172). Beispielsweise ist der JNK Inhibitor VIII ein irreversibler intrazellulärer JNK Inhibitor, dessen Mechanismus von der Modifikation eines konservierten Cysteins im ATP-Bindemotiv abhängig ist. Neben c-Jun phosphorylieren und aktivieren die JNK MAPK Transkriptionsfaktoren wie ATF2, Trp53, NFAT, Elk-1 und JunB welche infolgedessen die Expression von Genen regulieren, die in Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose involviert sind (160, 165).

2.5.2 Die Bedeutung des MAPK Signalweges bei Ausdauersport im Skelettmuskel

Der Skelettmuskel exprimiert verstärkt die JNK und JNK2 MAPK (176, 177), die ERK1/2 MAPK (177, 178) und die p38 MAPK (177, 179).

Die ERK1/2 MAPK kann im Skelettmuskel sowohl durch Ausdauer- als auch durch Kraftsport aktiviert werden (180-182), wobei dies in Abhängigkeit von der Intensität erfolgt (162, 183). Im humanen Skelettmuskel ist ERK1/2 nach einem 60-minütigen Radfahren (70 % VO₂max) aktiviert (183-186). Die Phosphorylierung von ERK1/2 nimmt dabei sehr schnell zu und ist nach 10 Minuten maximal aktiviert (184, 187). Ein einbeiniger Radsport verursacht bei Menschen eine Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung nur im Skelettmuskel des beanspruchten Beines, was impliziert, dass diese Aktivierung primär durch lokale Faktoren verursacht wird (184, 186). Im Skelettmuskel von Ratten und Mäusen ist ERK1/2 nach einem Ausdauerlauf auf einem Laufband induziert (42, 188, 189). Eine *in vitro* Kontraktion in isolierten Ratten- und Mausmuskeln führte ebenfalls zu einer verstärkten ERK1/2 Phosphorylierung (190-192).

Auch die JNK MAPK ist nach 60 Minuten Radfahren (70 % VO₂max) (186, 193) oder einem Marathonlauf (194) im humanen Skelettmuskel aktiviert. Nach dem Radfahren konnte ebenso eine Zunahme der c-Jun mRNA Expression detektiert werden (193). Eine *in situ* Kontraktion führt im Rattenmuskel zu einer zeitabhängigen Zunahme der JNK und c-Jun Phosphorylierung (187). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein *in vitro* Krafttraining („Stretching“, Spannung 0.24 N, 20-25 % Längenzunahme) im Rattenmuskel zu einer stärkeren Aktivierung von JNK und p38 als nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf führt, wobei diese Aktivierung im oxidativen Soleus Muskel stärker ausgeprägt war als im glykolytischen EDL Muskel (195).

Eine Aktivierung der p38 MAPK konnte bisher nach einem Ausdauerlauf sowie bei *in situ* und *in vitro* Muskelkontraktionen im Rattenmuskel (195, 196) als auch im humanen Skelettmuskel infolge Radfahrens (184) und eines Marathonlaufs (194, 197) detektiert werden. Auch nach einem einbeinigen Radfahren war die p38 MAPK im humanen Skelettmuskel aktiviert, wobei diese im Vergleich zu ERK1/2 auch im unbelasteten Skelettmuskel auftrat und weniger stark ausfiel (193). Es wird angenommen, dass die Aktivierung durch die p38 γ Isoform realisiert wird, welche nur im Skelettmuskel exprimiert ist (29, 198).

Die akute Aktivierung dieser Signalwege führt zu kurzfristigen Transkriptionsänderungen, wie z.B. von IEGs sowie myogener und transkriptioneller Regulatoren oder von Genen des Kohlenhydrat-Metabolismus, der Lipidaktivierung, des mitochondrialen Metabolismus und der oxidativen Phosphorylierung (199-202). So regulieren die MAPK z.B. die Ausdauersport-induzierte transkriptionelle Aktivität von PGC1 α und c-Jun, was letztendlich zu einem veränderten Metabolismus führt.

Die Fettsäureaufnahme und -oxidation während einer Muskelkontraktion kann durch ERK1/2 und AMPK in Abhängigkeit von der Kontraktionsintensität reguliert werden (203). Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass die Regulation der ERK1/2 abhängigen Fettsäureaufnahme während einer Muskelkontraktion in Ratten Skelettmuskeln vermutlich durch das Membranprotein CD36 erfolgt (204).

Eine Aktivierung der p38 MAPK reguliert teilweise den durch Sport induzierten Glukosetransport im Skelettmuskel (205).

Somit stellen die MAPK Signalwege im Skelettmuskel während einer Ausdauerbelastung eine wichtige Verbindung zwischen den extrazellulären mechanischen Stimulationen und den Trainings-induzierten adaptiven Veränderungen dar, indem sie die extrazellulären Signale in den Zellkern weiterleiten um in der Folge IEGs zu aktivieren, die dann für eine Umwandlung dieser Signale in eine zelluläre Antwort zuständig sind (186).

2.5.3 Die Bedeutung des MAPK Signalweges bei Ausdauersport in der Leber

Ein akuter Ausdauersport verursacht auch in der Leber eine signifikante Änderung in der Genexpression metabolischer Signalwege, die in den Fettsäuremetabolismus, Glykolyse/Glukoneogenese, Arachidonsäuremetabolismus sowie die Insulin- und PPAR Signalweiterleitung involviert sind (130).

Ein 60-minütiger Ausdauerlauf auf einem Laufband verursacht in der Leber von Mäusen eine signifikant verstärkte Phosphorylierung der JNK MAPK (130), wohingegen eine Aktivierung der p38 MAPK nicht festgestellt werden konnte. Eine Aktivierung der ERK1/2 MAPK konnte direkt nach dem Ausdauerlauf über die verstärkte Phosphorylierung einer ERK-Isoform detektiert werden (130).

Die Ausdauersport-induzierte Aktivierung der MAPK könnte unter anderem zu einer signifikant verstärkten Expression von Transkriptionsfaktoren sowie zu einer veränderten hepatischen Genexpression führen. So konnte unter anderem eine signifikant verstärkte Ausdauersport-induzierte Expression der IEGs c-Fos, c-Jun, GADD45g, JunB und FosB (siehe Kapitel 1.5.2) in der Leber der Mäuse assoziiert werden (130).

Dabei wurde auch gezeigt, dass der Ausdauersport-induzierte metabolische Stress und die daraus resultierenden Plasmaglukosespiegel nicht nur zu einer Entleerung der Glykogenspeicher und der Induktion glukoneogenetischer Gene führen, sondern auch mit der Induktion von *Immediate early genes* (IEGs) wie c-Fos, c-Jun, GADD45g und JunB in der Leber von Mäusen assoziiert sind (130). Dies zeigt, dass der Abfall der Glukosekonzentration im Plasma während eines 60-minütigen Ausdauerlaufs direkt oder indirekt die hepatische Expression von sowohl metabolischen Genen als auch von IEGs bei Mäusen induziert.

2.6 Die Bedeutung früh exprimierter Gene (IEG) und Zytokine bei Ausdauersport in Leber und Muskel

2.6.1 Immediate early genes (IEG)

Als *Immediate early genes* werden Gene bezeichnet (206), deren Expression innerhalb weniger Minuten zumeist nach einer extrazellulären Stimulation stark ansteigt und ebenso rasch wieder abfällt (207). Die Protoonkogene c-Fos und c-Myc waren die ersten IEGs, die in Maus Fibroblasten identifiziert wurden (208, 209). Ein wesentliches Merkmal der IEGs sind ihre geringen oder nicht detektierbaren basalen Expressionslevel. Viele IEGs sind Transkriptionsfaktoren

und Schlüsselregulatoren für Zellwachstum und Zelldifferenzierung (206). IEGs besitzen häufig eine Konsensussequenz (CArG Box) innerhalb des Promotors, über die sie mit Hilfe des SRF aktiviert werden (210).

Die am besten charakterisierten IEGs gehören zur Fos und Jun Familie, wie beispielsweise c-Fos, FosB, die Fos zugehörigen Antigene Fra1 und Fra2 sowie c-Jun, JunB und JunD (211). Die Mitglieder der Fos Familie formen mit Jun Proteinen ein Heterodimer und bilden somit den transkriptionell aktiven AP-1 Komplex (211). Außerdem sind die Mitglieder der Jun Familie in der Lage, Homo- oder Heterodimere mit anderen Jun Proteinen zu bilden (211).

Weitere bekannte IEGs sind die GADD45 Proteine, von denen vor allem die Isoformen GADD45b und GADD45g in der Leber und im Skelettmuskel exprimiert sind (212).

Fos und Jun sind wichtige Regulatoren der Zellproliferation, Apoptose, Inflammation und DNA-Reparatur (213-217).

2.6.1.1 Regulation der IEGs

C-Fos ist eines der am besten charakterisierten IEGs. Die Aktivität von c-Fos wird vor allem durch die MAPK Signalwege und teilweise auch durch die Proteinkinase-C (PKC) reguliert (218). Nach der Translokation der MAPK in den Nukleus phosphorylieren diese u.a. den *Ternary complex factor* (TCF) Elk-1, der die c-Fos Induktion vermittelt. Der Transkriptionsfaktor Elk-1 gehört zur Familie der Ets-Onkogene (219). C-Fos besitzt ein *Serum response element* (SRE) in seinem Promotor mit dem es an den SRF bindet (220, 221) und nachfolgend einen ternären Komplex mit TCFs wie Elk-1 bildet (222).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die TCFs wichtige Vermittler der transkriptionellen c-Fos Aktivität sind (223). So hängt die transkriptionelle Aktivität von Elk-1 von seiner Phosphorylierung ab, die durch den MAPK Signalweg reguliert wird (164). Nach seiner Phosphorylierung durch die ERK1/2 MAPK verstärkt Elk-1 die c-Fos Transkription (222). Eine Hemmung der Bildung oder Aktivität des ternären Komplexes verursacht wiederum eine Herunterregulation der c-Fos Transkription (164). Auch andere Transkriptionsfaktoren wie JunB, Erg-1 und der *Nerve growth factor IB* (Nur77) besitzen ein SRE (164, 224). Die Phosphorylierung von Elk-1 durch die MAPK kann an mindestens 9 Resten in seiner C-Domäne stattfinden (225), wobei die Stellen Ser383 und Ser389 essentiell für seine transkriptionelle Aktivität sind (164). Nach seiner Aktivierung verstärkt Elk-1 seine DNA-Bindung an das SRE sowie die Mobilisierung von Coaktivatoren wie *CREB-binding protein* (CBP), p300 oder Srb (164).

Elk-1 wird hauptsächlich durch ERK1/2, aber auch durch JNK und p38 phosphoryliert und aktiviert (226-228). Eine Aktivierung von Elk-1 durch die ERK1/2 MAPK erfolgt *in vivo* und

in vitro durch die Stimulation von Wachstumsfaktoren (229, 230), während eine Aktivierung durch die JNK oder die p38 MAPK eher durch UV-Strahlung, Stress oder IL-1 induziert wird (227, 228). Auch in der Calcium-induzierten c-Fos Genexpression spielen die MAPK eine wichtige Rolle. So verursacht der bei einer Depolarisation ausgelöste Calcium-Influx im Skelettmuskel unter anderem eine Aktivierung von ERK1/2, p38, CREB, c-Fos und c-Jun (231). Eine Inhibition der ERK1/2 MAPK mit U0126 sowie der p38 MAPK mit SB-203580 führt dabei zu einer verminderten CREB und IEG Aktivität in Ratten Myotuben (231).

2.6.2 IEGs und Sport

Wie bereits unter 1.2.3.2 beschrieben, kommt es bei Ausdauersport zur Aktivierung der MAPK im arbeitenden Skelettmuskel und darüber hinaus zur Expression von IEGs. Puntschaart *et al.* konnten im humanen Skelettmuskel zeigen, dass nach einem 30-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband die Expression von c-Fos, FosB, Fra-1 und c-Jun und JunB direkt bzw. 30 Minuten nach einem 30-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband signifikant erhöht war. Dabei war die Aktivität der Fos Gene stärker beeinflusst als die der Jun Gene (211). Diese Ergebnisse unterscheiden sich allerdings von tierexperimentellen Studien. So konnten Michel *et al.* im Hasen Tibialis Muskel erst 4 Stunden nach einer chronischen elektrischen Muskelstimulation einen Anstieg der c-Fos und auch der Egr1 mRNA aufzeigen (232). Ebenso war der Kontraktions- induzierte Anstieg der c-Jun Expression verzögert (232). In Übereinstimmung damit konnten auch Goldspink *et al.* im Hasen EDL Muskel nach einer mechanischen Stimulation einen Anstieg der c-Fos und c-Jun Expression erst nach 4 bis 6 Stunden beobachten (233). Eine gleichzeitige Muskeldehnung und elektrische Stimulation führt zu einem biphasischen Anstieg der c-Fos und c-Jun mRNA nach einer sowie nach 4 bis 6 Stunden (233). Osbaldeston *et al.* konnten zeigen, dass eine Muskeldehnung im Hasen Latissimus dorsi (LD) Muskel nach einer Stunde zu einem Anstieg der c-Fos und c-Jun Expression führt, während eine elektrische Stimulation des Skelettmuskels erst nach 4.5 bis 6 Stunden in einem Anstieg dieser IEGs resultiert (234).

Bei *in vivo* Mausstudien waren die c-Fos und c-Jun mRNA Expression im Skelettmuskel nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf signifikant erhöht (188). Dagegen wurde im Skelettmuskel von Ratten direkt nach einem Ausdauerlauf eine signifikante Zunahme der c-Fos mRNA Expression nachgewiesen, während ein Anstieg der c-Jun mRNA Expression erst nach einer dreistündigen Erholungsphase auftrat (235).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte ein 5-tägiges Ausdauertraining auf einem Laufband im Ratten Soleus Muskel keine signifikante Zunahme der c-Fos und c-Jun mRNA Expression, weder direkt nach dem Lauf noch nach einer dreistündigen Erholungsphase (235). In einer weiteren Studie mit Ratten reagierte der EDL Muskel nach einem 5-tägigen Ausdauertraining und einer 6- und 12-stündigen Erholungsphase mit einer signifikanten Zunahme der c-Fos Protein-spiegel (236).

Auch in der Leber konnte nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf eine signifikante Zunahme der c-Fos, c-Jun, GADD45g, FosB und JunB Expression nachgewiesen werden (130).

Eine Aktivierung der IEGs während einer sportlichen Belastung ist von deren Intensität, Dauer und Modus abhängig und führt zu einer Neusynthese verschiedener Proteine (206).

Die Bedeutung der IEGs bei Ausdauersport in Leber und Muskel konnte bisher nicht geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass die IEGs zumindest im kontrahierenden Skelettmuskel bei Ausdauersport die Aufgabe wichtiger Botenstoffe übernehmen (232) und in eine Anpassung an die Ausdauerbelastung involviert sind (186). So spielen c-Fos und c-Jun im Skelettmuskel wahrscheinlich bei Ereignissen wie der mitochondrialen Biogenese, myozellulären Verletzungen und Apoptose eine wichtige Rolle, die unter anderem nach einem Ausdauersport auftreten (214, 237-239).

2.6.3 Zytokine und Sport

Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass auch der Skelettmuskel diverse biologisch aktive Peptide freisetzt (240), die autokrin oder parakrin wirken können und als Myokine bezeichnet werden (241, 242). Durch die Sekretion dieser Myokine, zu denen Cyto- und Chemokine wie IL-6, IL-8 bzw. CXCL1 gehören, übernimmt der kontrahierende Muskel während einer Ausdauerbelastung auch endokrine Funktionen (243-246). Das murine CXCL1 ist ein zur Cystein-X-Cystein-Bindemotiv-Familie gehörendes Chemokin (242) und gilt als ein funktionelles Homolog zu humanem IL-8 (245, 247). Diese Myokine wirken in einer auto- oder parakrinen Weise und können in die Glukoseaufnahme des Skelettmuskels und die Fettsäureoxidation involviert sein (245). In der Zirkulation werden den Myokinen hormonähnliche Wirkungen zugeschrieben, indem sie die hepatische Glukoseproduktion und die Lipolyse im Fettgewebe regulieren (245).

Mittlerweile gibt es Anhaltspunkte, dass auch die Leber sogenannte Hepatokine produziert, die direkt den Glukose- und Fettmetabolismus beeinflussen (248).

Es hat sich herausgestellt, dass Myokine auch während eines Ausdauersports eine bedeutende Rolle spielen. Das bekannteste Myokin ist Interleukin (IL)-6. Es wird im humanen Skelettmuskel nach Ausdauersport in Typ-1 und Typ-2 Muskelfasern verstärkt exprimiert (240). Dabei hat sich gezeigt, dass die IL-6 Plasmaspiegel kontinuierlich mit der Belastungsdauer steigen (249) und auch die Belastungsintensität von großer Relevanz ist (250). Nach einem moderaten Ausdauersport und einer 30-minütigen Erholungsphase ist die IL-6 Expression im humanen Skelettmuskel vor allem bei niedrigen Glykogen-Spiegeln erhöht (251). Im Skelettmuskel kann IL-6 über eine Aktivierung der AMPK die Fettsäureoxidation und Glukoseaufnahme erhöhen und über eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt Signalweges die Glykogensynthese steigern (240). Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre zeigen sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen, dass auch in der Leber während eines Ausdauerlaufs der JAK/STAT Signalweg induziert wird (117, 121). Inwieweit dieser IL-6 abhängige Signalweg in die hepatische Stress-Abwehr bzw. in die metabolischen Adaptationen bei Ausdauersport involviert ist, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden.

Ausdauer- und Kraftsport führt im humanen Skelettmuskel durch die Expression von IL-8 (252-254) vermutlich zu einer Stimulation der Angiogenese (255). Bei Mäusen konnte nach Ausdauersport eine Erhöhung des CXCL1 Plasmaspiegels und eine gesteigerte CXCL1 Expression in Skelettmuskel und Leber beobachtet werden (256), wobei diese in der Leber vermutlich von der IL-6 Expression des Skelettmuskels abhängig ist (256). Auch in Mausmuskelzellen (C2C12) konnte eine erhöhte CXCL1 Expression nach einer EP-Stimulation gezeigt werden (242).

Die Bedeutung der Ausdauersport-induzierten CXCL1 Expression ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wurde jedoch schon gezeigt, dass eine Überexpression von CXCL1 im Skelettmuskel von Mäusen zu einer Minderung einer Nahrungs-induzierten Fettspeicherung und *ex vivo* zu einer verbesserten Fettsäureoxidationsrate führt (257).

3 Zielstellung

Regelmäßige körperliche Aktivität ist mit einer Vielzahl von präventiven Wirkungen verbunden, insbesondere kann es das Auftreten metabolischer Störungen, wie Insulinresistenz und T2DM verhindern.

Gleichzeitig führt Ausdauersport jedoch auch zu einer Reihe von Stressreaktionen im Körper, deren Bedeutung bis heute nicht verstanden ist. So kommt es im Skelettmuskel durch die erhöhte Beanspruchung zu mechanischem, aber auch zu oxidativem und energetischem Stress. Die Stresssituationen während eines Ausdauersports führen im Skelettmuskel nachweislich zu einer Aktivierung von MAPK und zur Induktion verschiedener Immediate early genes (IEG) und Cyto- bzw. Chemokine.

In den letzten Jahren konnte vor allem in Mausexperimenten gezeigt werden, dass auch die Leber durch Ausdauersport beeinflusst wird. Dies konnte unter anderem durch eine Induktion vieler hepatischer IEGs nachgewiesen werden. Die Expressionslevel dieser IEGs in der Leber korrelierten mit den Plasma Glukosekonzentrationen nach Sport.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Welche MAPK werden in der Leber von Mäusen durch Sport aktiviert?
2. Wie wirkt sich ein unterschiedlicher Energiestatus der Leber auf die Sport-induzierte MAPK Aktivierung und die IEG Expression in Leber und Skelettmuskel aus?
3. Welchen Einfluss hat der MEK1/2 Inhibitor U0126 auf die Sport-induzierte MAPK Aktivierung und die IEG Expression in Leber und Skelettmuskel?
4. Welche Wirkung hat die Inhibition von MAPK Signalkaskaden auf den Metabolismus während und nach Ausdauersport?

Zur Klärung dieser Fragen liefen C57Bl/6 Mäuse 60 Minuten auf einem Laufband bei moderater Geschwindigkeit. Um den Einfluss des Energiestatus zu untersuchen, wurden die Tiere vor dem Ausdauerlauf einer Nahrungsrestriktion ohne bzw. mit anschließender Wiederfütterung unterzogen.

Für die Untersuchung der Sport induzierten MAPK Aktivierung und IEG Expression in Leber und Muskel wurde der MEK Inhibitor U0126 den Mäusen 2 Stunden vor dem Ausdauerlauf appliziert. Um die Wirkung der MAPK Inhibition auf Leber, Skelettmuskel und Plasma zu untersuchen, wurden verschiedene metabolische Parameter in diesen Geweben gemessen.

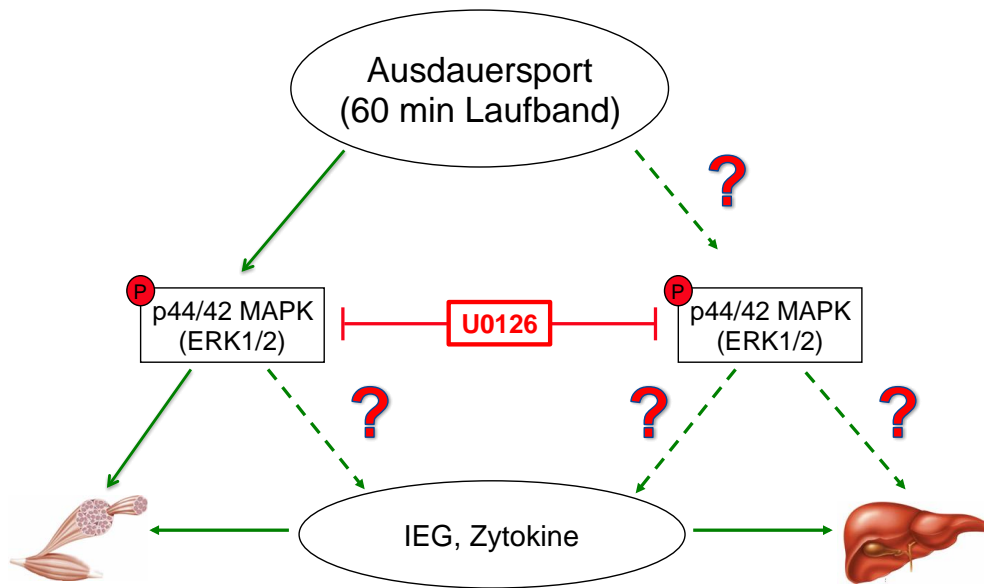


Abbildung 3.1: Wie wirkt sich eine Hemmung der ERK1/2 MAPK auf die Ausdauersport-induzierte IEG und Cytokin Expression in Skelettmuskel und Leber aus?

4 Material

4.1 Geräteliste

Laborgerät	Firma
Accu-Check® Aviva	Roche Diagnostics, <i>Mannheim, Deutschland</i>
Agfa Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa Healthcare, <i>Berlin, Deutschland</i>
CO ₂ Inkubator	Binder GmbH, <i>Tuttlingen, Deutschland</i>
Dounce Homogenisierer (2 ml)	Sartorius, <i>Göttingen, Deutschland</i>
Drucker, Selphy CP 510	Canon, <i>Krefeld, Deutschland</i>
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	b, b11 biotech service blue, <i>Schauenburg, Deutschland</i>
ELISA Reader Modell 680	Biorad, <i>München, Deutschland</i>
Inkubator für Bakterien	Heraeus, <i>Hanau, Deutschland</i>
Laborwaage	Sartorius, <i>Göttingen, Deutschland</i>
LC480	Roche Life Science, <i>Mannheim, Deutschland</i>
Magnetrührer	IKA Labortechnik, <i>Staufen, Deutschland</i>
Mastercycler Gradient	Eppendorf, <i>Hamburg, Deutschland</i>
Mikroskop Axiovert 40	Zeiss, <i>Oberkochen, Deutschland</i>
Mouse Accupacer Treadmill	Hugo Sachs Elektronik, <i>March-Hugstetten, Deutschland</i>
NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific, <i>Schwerte, Deutschland</i>
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG, <i>Lauda-Königshofen, Deutschland</i>
pH-Meter	InoLab WTW, <i>Weilheim, Deutschland</i>
Präzisionswaage ALJI60-4NM	Kern & Sohn GmbH, <i>Balingen, Deutschland</i>
Scanner CanoScan LiDe 110	Canon, <i>Krefeld, Deutschland</i>
Scepter, Zellzähler	Millipore, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
Sprout Minizentrifuge	Biozym, <i>Hessisch-Oldendorf, Deutschland</i>
Sterilbank, Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, <i>Schwerte, Deutschland</i>
Stromversorgungsgerät E 802	Consort N.V., <i>Turnhout, Belgien</i>

Systec DX-65 Autoklav	Systec, Wettenberg, Deutschland
ThermoStat Plus Inkubator	Eppendorf, <i>Hamburg, Deutschland</i>
Tisch-Schüttler	Hecht Assistent, <i>Sondheim, Deutschland</i>
TissueLyser	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
Vortex Genie 2	Scientific Industries, <i>New York, USA</i>
Wasserbad	Memmert, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
Western-Blot-Kammer	Hoelzel, <i>Wörth, Deutschland</i>
Zentrifuge Hettich Rotanda RPC	Andreas Hettich GmbH & Co KG, <i>Tuttlingen, Deutschland</i>
Zentrifuge Pico 17	Thermo Fisher Scientific, <i>Schwerte, Deutschland</i>
Zentrifuge, Biofuge Fresco	Heraeus, <i>Hanau, Deutschland</i>

4.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
3-Aminophtalhydrazid (Luminol)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, <i>Karlsruhe, Deutschland</i>
Acrylamid Lösung 30%, Rotiphorese Gel 30	Roth, <i>Karlsruhe, Deutschland</i>
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche, <i>Mannheim, Deutschland</i>
Bradford Reagenz, BIO RAD Protein Assay	Bio-Rad, <i>Freiburg, Deutschland</i>
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
cOmplete Protease Inhibitor	Roche, <i>Mannheim, Deutschland</i>
cOmplete Protease Inhibitor, EDTA-free	Roche, <i>Mannheim, Deutschland</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, <i>Karlsruhe, Deutschland</i>
DMEM high glucose (4,5 g / l), mit L-Glutamin	Lonza, <i>Köln, Deutschland</i>
DMEM high glucose (4,5 g / l), mit L-Glutamin	Life Technologies, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
DPBS	
Ethanol p.A.	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>

Ethylenglycol (EGTA)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Fetal Calve Serum (FCS) HyClone	Thermo Fisher Scientific, <i>Schwerte, Deutschland</i>
Forskolin	Appllichem, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Gelatine	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Glycerol	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Glycin	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
H ₂ O, HPLC-grade	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Hydrochloridsäure (HCL)	Appllichem, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Hydrogen Peroxid (H ₂ O ₂)	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Immobilon Western Chemiluminescent HRP	Millipore, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
Insulin, human recombinant	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Kaliumchlorid (KCL)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
L-Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl)	Lonza, <i>Köln, Deutschland</i>
Magermilchpulver	Appllichem, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Methanol Normapur	VWR, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TE-MED)	Roth, <i>Karlsruhe, Deutschland</i>
Natriumacetat Trihydrat	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumchlorid, 0,9 % Lösung	B. Braun, <i>Melsungen, Deutschland</i>
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, <i>München, Deutschland</i>
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
p-Iodphenol	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Penicillin / Streptomycin	Lonza, <i>Köln, Deutschland</i>
Ponceau S	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>

Protein-Ladepuffer, Precision Plus Protein Standards TM	Bio-Rad, <i>Freiburg, Deutschland</i>
RPMI 1640	Life Technologies, <i>Darmstadt, Deutschland</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) ultrapure for ECL	MP Biomedicals Inc., <i>Solon, OH, USA</i>
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Trizma [®] Base (TRIS)	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Trypsin / EDTA	Lonza, <i>Köln, Deutschland</i>
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, <i>München, Deutschland</i>
Insulin RIA	Linco Research, <i>St. Charles, MO, USA</i>

4.3 Injektionen

Injektionslösung	Hersteller
Ketamin-ratiopharm (500 mg / 10 ml) Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, <i>Ulm, Deutschland</i>
Xylazin 2 %	Albrecht GmbH, <i>Aulendorf, Deutschland</i>

4.4 Inhibitoren

Name	Funktion	Hersteller
JNK Inhibitor VIII	JNK Inhibitor	Calbiochem, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
PD184352	MEK Inhibitor	Calbiochem, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
PD98059	MEK Inhibitor	Calbiochem, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
U0126	MEK Inhibitor	Calbiochem, <i>Schwalbach, Deutschland</i>

4.5 Kommerzielle Kits, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Blotting Membran Protran BA85 (Nitrocellulose)	Whatman, <i>Dassel, Deutschland</i>
Blotting Papier	Whatman, Dassel, Deutschland
Bradford Protein Assay	Biorad, <i>München, Deutschland</i>
CL-Xposure Film (X-ray Film)	Thermo Fisher Scientific, <i>Schwerte, Deutschland</i>
Costar 150mm, Zellkultur	Corning B.V. Life Science, <i>Amsterdam, Niederlande</i>
Costar 6-well plates, Zellkultur	Corning B.V. Life Science, <i>Amsterdam, Niederlande</i>
ECL Hyperfilm	GE Healthcare Life Sciences, <i>Freiburg, Deutschland</i>
ELISA Mikroplatte, 96-well, PS	Greiner Bio One, <i>Frickenhausen, Germany</i>
epT.I.P.S.® Dual-filter, Pipettenspitzen, 0.1-10 µl	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
epT.I.P.S.® Dual-filter, Pipettenspitzen, 2-100 µl	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
epT.I.P.S.® Dual-filter, Pipettenspitzen, 2-200 µl	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
epT.I.P.S.® Reloads, Pipettenspitzen 0.1-10 µl	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
epT.I.P.S.® Reloads, Pipettenspitzen 100-1000 µl	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
epT.I.P.S.® Reloads, Pipettenspitzen 2-200 µl	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
Falcon, Polypropylene, 15 ml, 50 ml	BD Biosciences, <i>Heidelberg, Deutschland</i>

Immobilon Western HRP Substrate Lu- minol Reagenz	Millpore, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
Insulin RIA	Linco Research, <i>St. Charles, TN, USA</i>
Lightcycler 480 Multiwell Plates 96, white	Roche Life Science, <i>Mannheim, Deutschland</i>
Mikro-Probengefäß EDTA, 1,3 ml	Sarstedt, <i>Nürnbrecht, Deutschland</i>
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
NE-PER Nuclear Protein Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, <i>Schwerte, Deutschland</i>
Nitrocellulose Membran Protran	GE Healthcare Life Sciences, <i>München, Deutschland</i>
PeqGOLD TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, <i>Erlangen, Deutschland</i>
Precision Plus Protein Dual Color Stan- dard (1610374)	Biorad, <i>München, Deutschland</i>
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
Quantifast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
Reaktionsgefäß Safe-Lock, 0,5 ml	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
Reaktionsgefäß Safe-Lock, 1,5 ml	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
Reaktionsgefäß Safe-Lock, 2,0 ml	Eppendorf AG, <i>Hamburg, Deutschland</i>
RNase-Free DNase Kit	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
RNeasy Mini Kit	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
SafeGuard Filterspitzen, 100-1000 µl	Peqlab Biotechnologie, <i>Erlangen, Deutsch- land</i>
SafeSeal Tips Premium, 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, steril	Biozym, <i>Hessisch Oldendorf, Deutschland</i>
Stahlkugeln, rostfrei, 5 mm	Qiagen, <i>Hilden, Deutschland</i>
Steril Pipette (Stripette), 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, Polystyrene	Corning B.V. Life Science, <i>Amsterdam, Nie- derlande</i>

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics, <i>Mannheim, Deutschland</i>
Zellkulturschalen 6-well, 12-well	TPP, <i>Trasadingen, Schweiz</i>
Zellkulturschalen, 10 cm, 15 cm	TPP, <i>Trasadingen, Schweiz</i>
HR Series NEFA-HR(2) Assay	Wako Chemicals GmbH, <i>Neuss, Deutschland</i>
Advia 1650 Triglyzeride Assay	Siemens Healthcare, <i>Eschborn, Deutschland</i>

4.6 Computer Software

Software	Firma
JMP 10.0.0	SAS Institut Inc., <i>NC, USA</i>
Gelscan Professional V5.1	BioSciTec GmbH, <i>Frankfurt, Deutschland</i>

4.7 Antikörper

4.7.1 Primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Referenz-num- mer	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Anti-AMPK α 1	07-350	1:500	Millipore, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
Anti-AMPK α 2	07-363	1:500	Millipore, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
Anti-JNK/SAPK1	610627	1:500	BD Biosciences, <i>Heidelberg, Deutschland</i>
Anti-phospho-c-Jun (Ser73)	06-659	1:1000	Millipore, <i>Schwalbach, Deutschland</i>
c-Jun/AP1	sc-44 X	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, <i>Heidelberg, Deutschland</i>
CREB (c-21)	sc-186		Santa Cruz Biotechnology, <i>Heidelberg, Deutschland</i>

Material

ELK-1

355

1:500

Santa Cruz Biotechnology,
Heidelberg, Deutschland

Material

IGFBP1		6072	1:500	Santa Cruz Biotechnology, <i>Heidelberg, Deutschland</i>
p38 MAPK		9212	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>
p44/42 MAPK (ERK1/2)		9102	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>
Phospho-AMPK α (Thr172)		2535	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>
Phospho-CREB (Ser133)		9198	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>
Phospho-ELK-1 (Ser383)		8406	1:500	Santa Cruz Biotechnology, <i>Heidelberg, Deutschland</i>
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	MAPK	9211	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>
Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	MAPK	9101	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)		9251	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>
β -Aktin		4967	1:1000	Cell Signaling Technology, <i>Frankfurt, Deutschland</i>

4.7.2 Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Goat-anti-mouse-HRP	1:1000 - 1:3000	
Goat-anti-rabbit-HRP	1:1000 - 1:3000	

4.7.3 Kommerzielle Primer Assays für quantitative Real-time (qRT)-PCR

Gensymbol	Primer Assay Name	Konditionen und Hersteller
<i>Cxcl1</i>	Mm_Cxcl1_1_SG	Quantitect Primer Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland), Konditionen gemäß den Anleitungen des Herstellers
<i>Fgf21</i>	Mm_Fgf21_1_SG	
<i>Fos</i>	Mm_Fos_1_SG	
<i>Fosb</i>	Mm_Fosb_1_SG	
<i>G6pc</i>	Mm_G6pc_1_SG	
<i>Gadd45b</i>	Mm_Gadd45b_1_SG	
<i>Gadd45g</i>	Mm_Gadd45g_1_SG	
<i>Igfbp1</i>	Mm_Igfbp1_1_SG	
<i>Jun</i>	Mm_Jun_1_SG	
<i>Junb</i>	Mm_Junb_1_SG	
<i>Nr4a3</i>	Mm_Nr4a3_1_SG	
<i>Pdk4</i>	Mm_Pdk4_1_SG	
<i>Ppargc1a</i>	Mm_Ppargc1a_1_SG	
<i>Trp53</i>	Mm_Trp53_1_SG	

5 Methoden

5.1 Tierexperimentelle Methoden

5.1.1 Mausmodell

Das in dieser Arbeit verwendete C57Bl/6 Mausmodell wurde über die Firma Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Es wurden für alle Tierexperimente ausschließlich männliche Wildtyp-Mäuse verwendet.

5.1.2 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in der Tierhaltung des Interfakultären Instituts für Biochemie (IFIB) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen untergebracht. Die Tiere wurden in Gruppen von 3 bis 4 Mäusen in Typ IV Käfigen beherbergt (EBECO, Castrop-Rauxel, Deutschland). Wenn nicht anders angegeben hatten die Tiere permanenten Zugang zu Standardfutter Ssniff R/M-H (Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser. Mäuse sind nachtaktive Tiere. Um diese Aktivität für die Durchführung der Ausdauerlauf-Experimente auszunutzen, wurden alle Tiere in einem invertierten Hell-Dunkel-Zyklus gehalten (Dunkelphase 10.00 Uhr bis 22.00 Uhr; Lichtphase 22.00 Uhr bis 10.00 Uhr). Alle Ausdauerlauf-Experimente fanden in der Zeit von 11.00 Uhr bis 15.00 Uhr statt.

Alle Tierexperimente fanden nach den Tierschutzrichtlinien für Labortiere statt und wurden von der lokalen Einrichtung für Tierschutz und Labortierkunde überprüft. Nach Ankunft der Tiere wurden diese vor dem Start der Experimente zunächst für mindestens zwei Wochen an die neue Umgebung gewöhnt.

5.1.3 Ausdauerlauf der Mäuse auf einem Laufband

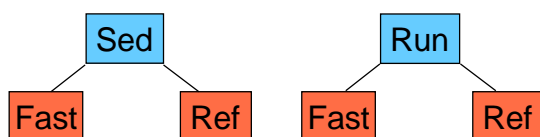
Das Laufband war ein 4-Kanal motorisiertes Laufband (4-channel Mouse Accupacer Treadmill, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten). Die Geschwindigkeit sowie die Steigung konnten manuell variiert werden. Die vier Bänder liefen alle in der gleichen eingestellten Geschwindigkeit, so dass man bis zu vier Mäuse gleichzeitig auf dem Laufband laufen lassen konnte. Zunächst wurden alle Mäuse an drei verschiedenen Zeitpunkten an das Laufband gewöhnt. Die letzte Gewöhnung wurde spätestens eine Woche vor dem eigentlichen Experiment durchgeführt. Um die Mäuse an die veränderte Umgebung zu gewöhnen, wurden sie zunächst etwa 5 min auf das ausgeschaltete Laufband gesetzt, welches dann bei einer Steigung von 5° zunächst

auf eine Geschwindigkeit von 1 m/min geschaltet wurde. Anschließend wurde die Geschwindigkeit stufenweise bis 5 m/min erhöht und für 10 min beibehalten. Zum zweiten Gewöhnungszeitpunkt wurde die Steigung des Laufbandes auf 10° erhöht und die Mäuse liefen nach einer langsamen Steigerung der Geschwindigkeit auf 10 m/min insgesamt 12 min. Die letzte Gewöhnung fand bei 15° Steigung des Laufbandes und einer Geschwindigkeit von 12 m/min für insgesamt 15 min statt.

In den finalen Experimenten absolvierten maximal zwei Mäuse gleichzeitig bei einer Geschwindigkeit von 13 m/min und einer Steigung von 15° den 60-minütigen Ausdauerlauf.

5.1.4 Nahrungsrestriktion und Wiederfütterung

Um die Effekte einer Nahrungsrestriktion und einer darauffolgenden Wiederfütterung in Verbindung mit Ausdauersport zu untersuchen, wurden 12 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse zunächst über Nacht Futter-depriviert. Allen Mäusen wurde von 18.00 Uhr bis zum nächsten Morgen 9.00 Uhr das Futter entzogen. Ein permanenter Zugang zu Wasser wurde durchgängig gewährt. Damit fiel ein Großteil der Nahrungsrestriktion in die Hell- bzw. weniger aktive Phase, in der normalerweise ein Großteil der regulären Nahrungsaufnahme der Tiere stattfindet (258). Am nächsten Morgen 9.00 Uhr wurde einer Gruppe Mäuse für 6 Stunden wieder Nahrung gegeben (Ref), während eine andere Gruppe auch für diese Zeit keine Nahrung bekam (Fast). Im Anschluss daran musste wiederum je eine Subgruppe dieser beiden Gruppen einen 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband (5.2.1) durchführen (Run), während eine zweite Subgruppe im Käfig verblieb (Sed). Es wurden zwei voneinander unabhängige Experimente mit n=6-8 Mäusen pro Gruppe durchgeführt.



Sed	Nicht gelaufen
Run	60-minütiger Ausdauerlauf
Fast	21 h Nahrungsrestriktion
Ref	15 h Nahrungsrestriktion und 6 h Wiederfütterung

Abbildung 5.1: Übersicht der Gruppenunterteilung bei Experiment Nahrungsrestriktion / Wiederfütterung.

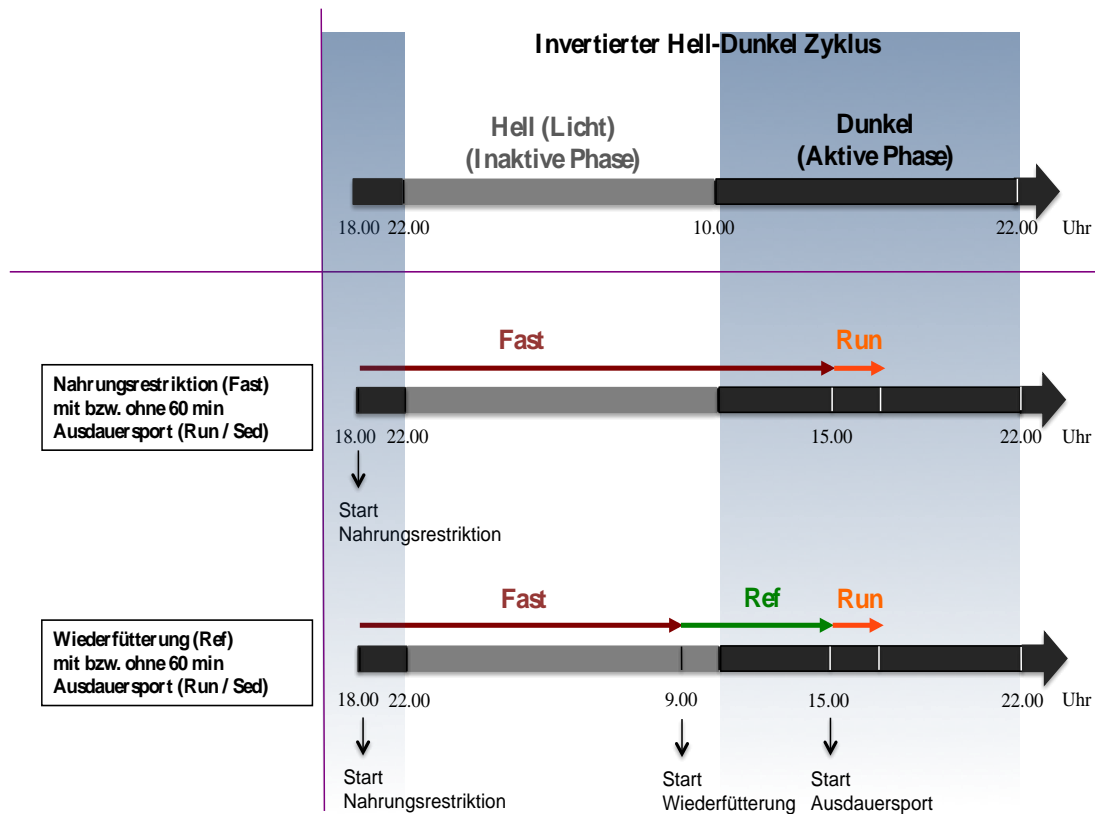
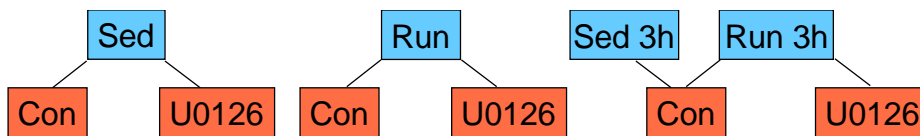


Abbildung 5.2: Zeitplan der Experimentdurchführung. Männliche C57Bl/6 Mäuse in einem Alter von 12 Wochen wurde über Nacht (15 h) das Futter entzogen (es wurde ein permanenter Zugang zu Wasser gewährleistet). Am nächsten Morgen erfolgte bei einem Teil der Tiere eine Wiederfütterung für 6 Stunden (Ref). Der zweite Teil der Tiere verblieb während dieser Zeit durchgängig ohne Nahrung (Fast). Anschließend musste ein Teil jeder Gruppe einen 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband absolvieren (Run), während der andere Teil im Käfig verblieb (Sed). Der Ausdauerlauf wurde bei einer Geschwindigkeit von 13 m/min und einer Steigung von 15° absolviert. Direkt im Anschluss wurden die Tiere per Dekapitation getötet. Das Blut wurde sofort für die Bestimmungen der Plasmawerte aufgefangen und Leber, Muskeln und Fett wurden für Genexpressions- und Western Blot-Analyse präpariert.

5.1.5 Applikation des Inhibitors U0126

Zur Untersuchung des Einflusses der MAPK auf Leber und Skelettmuskel bei Ausdauersport wurde 12 Wochen alten männlichen C57Bl/6 Mäusen der Inhibitor U0126 (Calbiochem) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Für eine geeignete Konzentration wurden mehrere Publikationen aus vorangegangenen, meist neurologischen Studien, verglichen (259-264). Aus einigen Publikationen ist bekannt, dass der Inhibitor für eine akute Behandlung in Konzentrationen von 0.2 µg/g bis 10 µg/g Körpergewicht eingesetzt wurde (260, 262, 263). Aus diesem Grund wurde in den vorliegenden Versuchen eine Konzentration von 5 µg U0126 pro g Körpergewicht (62

$\mu\text{mol/kg}$) eingesetzt. Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst. Direkt vor der Applikation wurde er nochmals in 0.9 % NaCl verdünnt, so dass die DMSO Endkonzentration 1.5 % betrug. Gleichzeitig wurde einer zweiten Gruppe von Mäusen eine Kontrolllösung i.p. injiziert (1.5 % DMSO in 0.9 % NaCl) (Con). Nach einer zweistündigen Inkubationszeit musste je eine Subgruppe dieser beiden Gruppen einen 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband durchführen (Run) (5.2.1), während die zweite Subgruppe im Käfig verblieb (Sed). In diesem Zusammenhang wurde für Genexpressionsanalysen im Skelettmuskel ein zweites Experiment realisiert, welches sich allein darin unterschied, dass sich an den 60-minütigen Ausdauerlauf eine dreistündige Erholungsphase anschloss (5.2.2), in der die Mäuse nach dem Ausdauerlauf noch einmal drei Stunden im Käfig verblieben, bevor sie getötet wurden. In diesem Experiment wurden für die Nicht-Läufer-Gruppe (Con/Sed 3h) ausschließlich Mäuse verwendet, denen eine Kontrolllösung appliziert wurde. Diese blieben nach der Injektion über den gesamten Zeitraum (bis drei Stunden nach dem Ausdauerlauf der anderen Gruppen) im Käfig. Jedes der genannten Experimente wurde mit $n=7-8$ Mäusen pro Gruppe in je zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.



- Sed** Nicht gelaufen
- Run** 60-minütiger Ausdauerlauf
- Con** 1.5 % DMSO in 0.9 % NaCl (i.p.)
- U0126** U0126 ($5\mu\text{g} / \text{g}$ Körpergewicht) in 0.9 % NaCl / 1.5 % DMSO (i.p.)
- Sed 3h** Nicht gelaufen
- Run 3h** 60-minütiger Ausdauerlauf + 3-stündige Erholungsphase

Abbildung 5.3: Übersicht der Gruppenunterteilung in U0126 Experimenten.

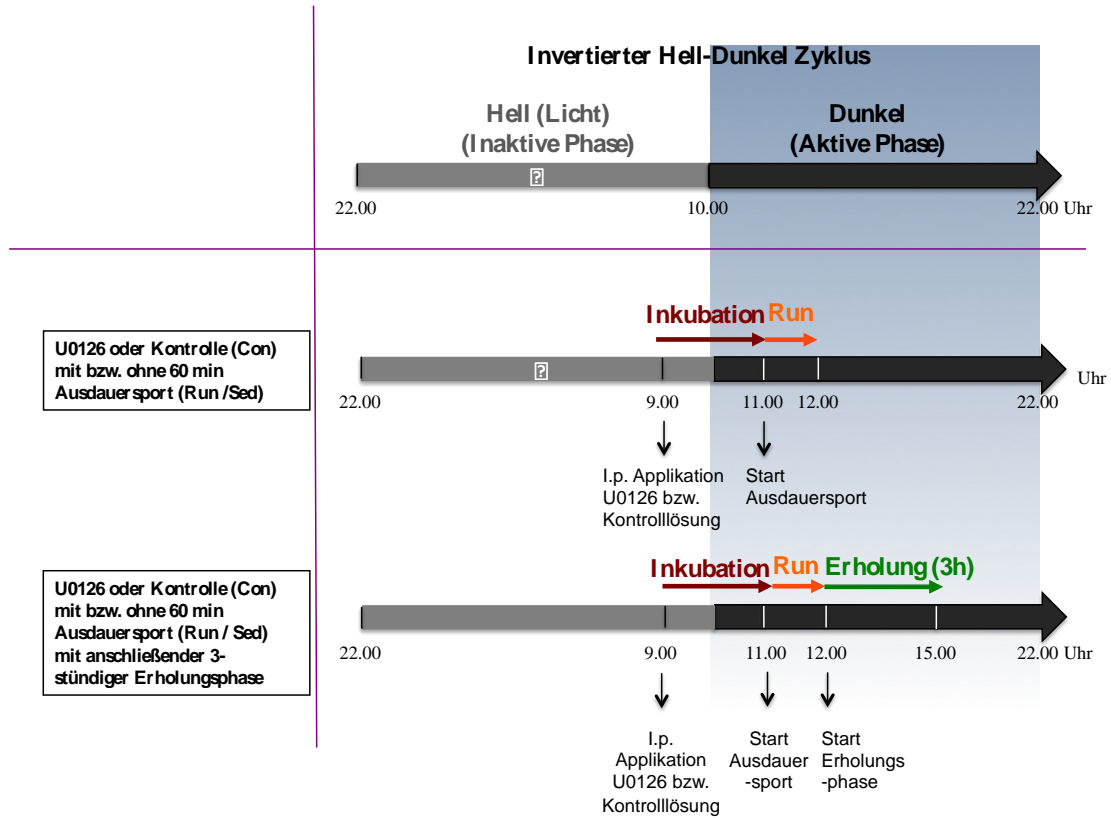


Abbildung 5.4: Zeitplan der Experimentdurchführung. Männliche C57Bl/6 Mäuse in einem Alter von 12 Wochen wurde der MAPK Inhibitor U0126 (gelöst in 1.5% DMSO und 0.9% NaCl) in einer Konzentration von 5 µg/g Körpergewicht i.p. appliziert. Eine Kontrollgruppe (Con) der Mäuse erhielt eine 0.9% NaCl / 1.5 % DMSO Lösung, die ebenfalls i.p. verabreicht wurde. Nach 2 h Inkubationszeit musste ein Teil jeder Gruppe einen 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband absolvieren (Run), während der andere Teil im Käfig verblieb (Sed). Der Ausdauerlauf wurde bei einer Geschwindigkeit von 13 m/min und einer Steigung von 15° absolviert. Direkt im Anschluss wurden die Tiere per Dekapitation getötet. Das Blut wurde sofort für die Bestimmungen der Plas-mawerte aufgefangen und Leber und Muskeln wurden für Genexpressions- und Western Blot-Analyse präpariert. In einem weiteren Experiment wurden die Tiere gleich behandelt, es folgte aber nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf eine dreistündige Erholungsphase (3h).

5.2 Ausdauerlauf Protokolle

5.2.1 Einmaliger 60-minütiger Ausdauerlauf

Für die Experimente wurden männliche, 12 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse miteinander verglichen. Der Ausdauerlauf startete bei einer Geschwindigkeit von 5 m/min und einer Steigung von 15°. Nach einer 5-minütigen Aufwärmphase wurde die Geschwindigkeit langsam auf 13 m/min

erhöht, bei der die Mäuse bis zu einer Gesamtdauer von 60 min liefen. Direkt im Anschluss an den Ausdauerlauf wurden die Mäuse getötet und präpariert. Während des 60-minütigen Ausdauerlaufs verblieben die Kontrollmäuse im Käfig und hatten permanenten Nahrungszugang.

5.2.2 60-minütiger Ausdauerlauf mit anschließender Erholungsphase

12 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse absolvierten einen 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband bei einer Geschwindigkeit von 13 m/min und einer Steigung von 15° (5.2.1). Anschließend wurden diese Tiere nicht sofort getötet, sondern kamen für weitere drei Stunden in den Käfig, wo sie wieder Zugang zu Futter und Wasser hatten. Alle nicht gelaufenen Mäuse (Sed) verblieben für die gesamte Zeitdauer in ihren Käfigen, hatten permanent Zugang zu Futter und wurden ebenfalls nach der dreistündigen Erholungsphase getötet.

5.3 Blut- und Gewebeentnahme und Analysen

Direkt im Anschluss an den 60-minütigen Ausdauerlauf bzw. nach einer darauffolgenden dreistündigen Erholungsphase wurde den Mäusen zunächst Blut aus der Schwanzspitze entnommen um den Blutglukosewert mit einem Blutzuckermessgerät (Accu-Check® Aviva, Roche) zu messen. Anschließend wurden die Mäuse durch eine i.p. Injektion von Ketamin (150 µg/g Körpergewicht) und Xylacin (10 µg/g Körpergewicht) anästhesiert. Die Wirkung der Narkose wurde durch den Zwischenzehenreflex überprüft. Danach wurden die Mäuse per Dekapitation getötet. Das dabei austretende Kopfblut wurde sofort aufgenommen, in ein EDTA-Mikro-Probengefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Proben wurden 2x bei 9000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Blutzellen zu entfernen. Der Überstand wurde jeweils in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. 20 µl des Plasmas wurden sofort in RIA-Röhrchen für die Insulin-Bestimmung überführt. Das übrige Plasma wurde anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Nach der Dekapitation und der Blutaufnahme wurden beginnend mit der Leber der Tiere alle übrigen Organe für spätere Proteinanalysen schnellstmöglich entnommen. Ein Stück der Leber wurde sofort auf Eis in Lysepuffer (Tabelle 5-1) mit einem Dounce Homogenisierer aufbereitet. Der Rest wurde mit einem Skalpell in größere (ca. 50 mg) und kleinere (ca. 20 mg) Stückchen aliquotiert. Die Stückchen wurden jeweils in ein Kryoröhrchen überführt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Die Skelettmuskeln wurden aus beiden Hinterbeinen immer als gesamter Muskel entnommen. Folgende Muskeln wurden für diese Arbeit genutzt: Soleus, Tibialis und Plantaris Muskel für

mRNA Analyse, EDL Muskel für Proteinanalyse und Gastrocnemius Muskel für Glykogenbestimmung. Aufgrund der kleinen Größe der Soleus Muskeln wurden pro Maus beide Muskeln für die RNA Isolierung verwendet, was eine zusätzliche Proteinanalyse ausschloss. Da der Soleus Muskel den größten Gehalt an langsamen (ST-) oxidativen Typ-1 Muskelfasern aufweist (265), wurde er bevorzugt für einen Vergleich der mRNA Genexpressionen zwischen Leber und Skelettmuskel herangezogen. Für einen Vergleich der Genexpression in den verschiedenen Muskeln untereinander wurden auch der Tibialis- und Plantaris Muskel für einige mRNA Expressionsanalysen verwendet.

5.3.1 Plasmaparameter

Die Plasmaglukosebestimmung erfolgte über das Schwanzblut der Mäuse mit einem Glukosemessgerät (Accu-Check® Aviva, Roche). Alle anderen Plasmaparameter wurden über das aus der Dekapitation stammende EDTA-Plasma gemessen. Die Insulinkonzentration wurde mittels Radioimmunoassay gemessen.

5.3.1.1 Messung der freien Fettsäuren im Plasma (FFA)

Die Messung der freien Fettsäuren (FFA) erfolgte mit dem HR Series NEFA-HR(2) Assay (WAKO Chemicals GmbH). Zunächst wurden 5 µl Plasma und ein zum Assay gehöriger Standard in eine ELISA-Mikroplatte (96-well) pipettiert. Um eine schnelle Lipolyse der Proben zu vermeiden, wurden sie zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Pro Probe wurden dazu 100 µl R1a Reagenz pipettiert. Nach einer Inkubation für 15 min bei 37°C wurden 50 µl R2a Reagenz zu den Ansätzen gegeben. Anschließend folgte nochmals eine Inkubation für weitere 15 min bei 37°C. Die Messung der freien Fettsäuren erfolgte in einem ELISA Reader (Modell 680, Biorad, München) bei einer Wellenlänge von 540 nm.

5.3.1.2 Messung der Triglyzeride im Plasma

Die Messung der Triglyzeride im Plasma erfolgte mit dem Advia 1650 Triglyzeride Assay (Siemens Healthcare). Der Assay besteht aus zwei Reagenzien (R1 und R1Mix) und einem Triglyzerid-Standard. Zunächst wurde eine Mischung aus beiden Reagenzien im Verhältnis 1:30 (R1Mix : R1) hergestellt. Anschließend wurden der (unverdünnte) Triglyzeridstandard und 5 µl Plasma von jeder Probe in eine ELISA-Mikroplatte (96-well) pipettiert und 100 µl des Reagenzien Mix zugegeben. Danach wurden die Proben in einem ELISA Reader (Modell 680, Biorad, München) bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die endgültige Berechnung

der Triglyzeridkonzentration erfolgte über die durch den Standard erhaltene Steigung der Kalibriergerade.

5.3.2 Glykogenbestimmung

Der Glykogengehalt in Leber und Gastrocnemius Muskel wurde durch die von Chan und Exton (266) beschriebene Methode bestimmt. Hierfür wurden ein Gastrocnemius Muskel (80 bis 100 mg) und ein kleines Stück Lebergewebe (20-30 mg) eingesetzt. Alle Gewebestücke wurden zunächst gewogen und dabei auf Trockeneis gelagert, um ein vorzeitiges Auftauen zu verhindern. Anschließend wurden die noch gefrorenen Gewebestücke in 250 µl einer 30 %igen KOH-Lösung überführt und für 15 min bei 90°C gelöst. Daraufhin folgte die Glykogen Präzipitation durch die Zugabe von 0.2 Volumen 1 M Na₂SO₄ und 3 Volumen 100 % Ethanol mit anschließender Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Präzipitate zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 50°C auf einem Thermoblock getrocknet. Die getrockneten Proben wurden dann in 300 µl 1 M HCl für 60 min bei 90°C hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und mit 50 µl HEPES und 250 µl 1 M NaOH neutralisiert. Es folgte eine wiederholte Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Die Messung der Glukosekonzentration erfolgte enzymatisch mit dem ADVIA 1650 System (Siemens Health Care Sector, Fernwald, Deutschland). Der Glykogengehalt ist in mg der gemessenen Glukose pro g Körpergewicht angegeben.

5.3.3 Messung der Triglyzeride in der Leber

Für die Messung der Triglyzeride in der Leber wurden zunächst kleine Lebergewebestücke (ca. 20-30 mg) gewogen, die während der gesamten Prozedur auf Trockeneis gelagert waren. Die Gewebestücke wurden zusammen mit einer Stahlkugel (5mm, Qiagen) in ein 2.0 ml Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurden 20 µl einer 0.15 M NaCl / 1 % Triton X-100 Lösung pro mg Gewebe zugegeben. In einem TissueLyser (Qiagen) wurden danach die Proben für 2x für je 2 min bei einer Frequenz von 20 Hz homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation der Gewebelysate für 10 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette mit dem sich an der Oberfläche befindlichen Fett wieder vermischt und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die sich anschließende Bestimmung der Triglyzeridkonzentrationen erfolgte wie in 5.3.1.2 beschrieben mit einem HR Series NEFA-HR(2) Assay (WAKO Chemicals GmbH). Zusätzlich wurden die Proteinkonzentrationen in den Proben bestimmt (siehe 5.5.3). Die endgültige Bestimmung der Triglyzeridkonzentrationen erfolgte durch den Bezug der bei

490 nm gemessenen Proben auf die jeweilige Proteinkonzentration. und ist in mg Triglyzeride pro g Protein angegeben.

5.3.4 Aufbereitung der Gewebelysate

Direkt nach der Präparation wurde je ein Stück Leber in 1 ml Lysepuffer (Tabelle 5-1), dem Phosphatase- (Tabelle 5-5) und Protease Inhibitoren (cOmplete, Roche) zugesetzt waren, mit einem Dounce Homogenisierer auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenisate 3x bei 13000 rpm zentrifugiert, wobei nach jedem Zentrifugationsschritt der Überstand entnommen und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (5.5.3) wurden die Lysate aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Der EDL Muskel wurde erst später aufbereitet. Dafür wurde ein gefrorener EDL Muskel in 350 µl Lysepuffer (Tabelle 5-1) in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß mit einer Stahlkugel (5 mm, Qiagen) aufgenommen und 2x 2 min bei 20 Hz in einem TissueLyser (Qiagen) homogenisiert. Nach Zentrifugation der Lysate für 2x 15 min bei 13000 rpm wurde eine Proteinbestimmung (5.5.3) durchgeführt. Die Lysate wurden á 40 µg Protein aliquotiert und bei -80°C gelagert.

50 mM	Tris
150 mM	NaCl
1 %	Triton X-100

Tabelle 5-1: Lysepuffer für Protein Isolation in Leber und Muskel

Dem Lysepuffer wurden direkt vor Benutzung Phosphatase- und Proteaseinhibitoren (cOmplete Tablette, Roche) zugesetzt.

5.4 Zellkultur

5.4.1 Verwendete Zelllinien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten C2C12 Zellen (Maus Myoblasten, CRL-1772™) wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) bezogen.

Die Zellen wurden auf Zellkulturplatten von TPP kultiviert.

5.4.2 C2C12 Kultivierung

Die C2C12 Zellen wurden in einem Zellinkubator mit 5% CO₂, 95% Luftfeuchte und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Die Anzucht der Zellen erfolgte in DMEM Wachstumsmedium (4.5 g Glukose / l), dem 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin zugesetzt waren. Für die Fusion der Zellen und die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben wurden die C2C12 Zellen in DMEM (4.5 g Glukose/l) mit 2 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Medium wurde regulär alle 2 Tage gewechselt. Für die Experimente wurden die Zellen zunächst zwei Tage in Wachstumsmedium und anschließend sieben Tage in Fusionsmedium kultiviert.

Das Wachstum der Zellen erfolgte in 15 cm Zellkulturschalen (TPP). Für die Experimente wurden 2.5×10^5 Zellen pro Well in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät.

Für eine Langzeitlagerung wurden die Zellen in 1 ml DMSO (10 %) in FCS resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und entweder bei -140°C oder in Flüssigstickstoff gelagert.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.4.3 Zellsplittung

Nach Erreichen der Konfluenz (ca. 80 %) wurden die Zellen gesplittet und auf neue 15 cm Zellkulturschalen oder 6-Well-Platten ausgesät. Dafür wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 10 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Trypsin Aktivität wurde geblockt, indem Wachstumsmedium zugesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 900 rpm für 4 min bei RT zentrifugiert und das Medium abgenommen. Daraufhin wurde das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe des Scepter Zellzählers von Millipore ermittelt.

5.4.4 Transfektion der Zellen mit siRNA

Für die siRNA Transfektion wurden 2.5×10^5 C2C12 Zellen pro Well in einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden zunächst wie oben beschrieben in Wachstumsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Differenzierung der Zellen mit Fusionsmedium. Das Fusionsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Am 5. Tag der Differenzierung erfolgte die siRNA Transfektion für insgesamt 40 Stunden. Dafür wurde zunächst das Fusionsmedium gewechselt und anschließend pro Well 190 μ l des folgenden Mixes hinzugegeben:

182 μ l	DMEM (ohne FCS, Penicillin und Streptomycin)
5 μ l	ERK1 siRNA (MAPK3)
5 μ l	ERK2 siRNA (MAPK1)
8 μ l	INTERFERin® (Polyplus)

Tabelle 5-2: Komponenten der siRNA Transfektion.

Nach 40 Stunden wurde die Transfektion abgebrochen, indem das Medium aspiriert und neues Fusionsmedium (siehe oben) zugegeben wurde. Sofort im Anschluss erfolgte die 4-stündige EP-Stimulation.

5.4.5 Applikation der Inhibitoren

Für die Experimente wurden 2.5×10^5 C2C12 Zellen pro Well in 6-Well Zellkulturplatten mit Wachstumsmedium ausgesät. Nach zwei Tagen erfolgte ein Medienwechsel gegen Fusionsmedium (siehe oben). Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach sieben Tagen Zelldifferenzierung erfolgte letztmalig ein Medienwechsel. Gleichzeitig wurden pro Well die gegebenen Inhibitoren in den folgenden Konzentrationen zugegeben:

Name	Konzentration [μ M]	Stockkonzentration in...	gelöst	Zugabe pro Well [μ l]
JNK Inhibitor VIII	10	10 mM in DMSO		2
PD184352	1	10 mM in DMSO		0.2
PD98059	50	50 mM in DMSO		2
U0126	10	10 mM in DMSO		2

Tabelle 5-3: Verwendete Inhibitoren und eingesetzte Konzentrationen.

Die Vorinkubation der Inhibitoren erfolgte für 30 min bei 37°C. Anschließend erfolgte ohne nochmaliges Wechseln des Mediums die 4-stündige EP-Stimulation.

5.4.6 EP-Stimulation der differenzierten C2C12 Zellen

Die EP-Stimulation der C2C12 Zellen erfolgte mit dem C-PACE EP Culture Pacer von IonOptix (Dublin, Irland). Hierbei handelt es sich um einen mehrkanaligen Stimulator, mit dessen Hilfe man Muskelzellen chronisch elektrisch stimulieren kann (IonOptix). Somit ist es möglich Muskelkontraktionen, wie sie z.B. bei Ausdauersport vorkommen, in einem Zellsystem zu simulieren. Die Zellen werden hierbei über Kohlenstoffelektroden (ebenfalls von IonOptix), die an den C-PACE EP Culture Pacer angeschlossen werden, zu den eingestellten Konditionen permanent elektrisch stimuliert.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die C2C12 Zellen bei einer Spannung von 14 V und einer Frequenz von 5 HZ für 2 ms für die Gesamtdauer von 4 h chronisch stimuliert.

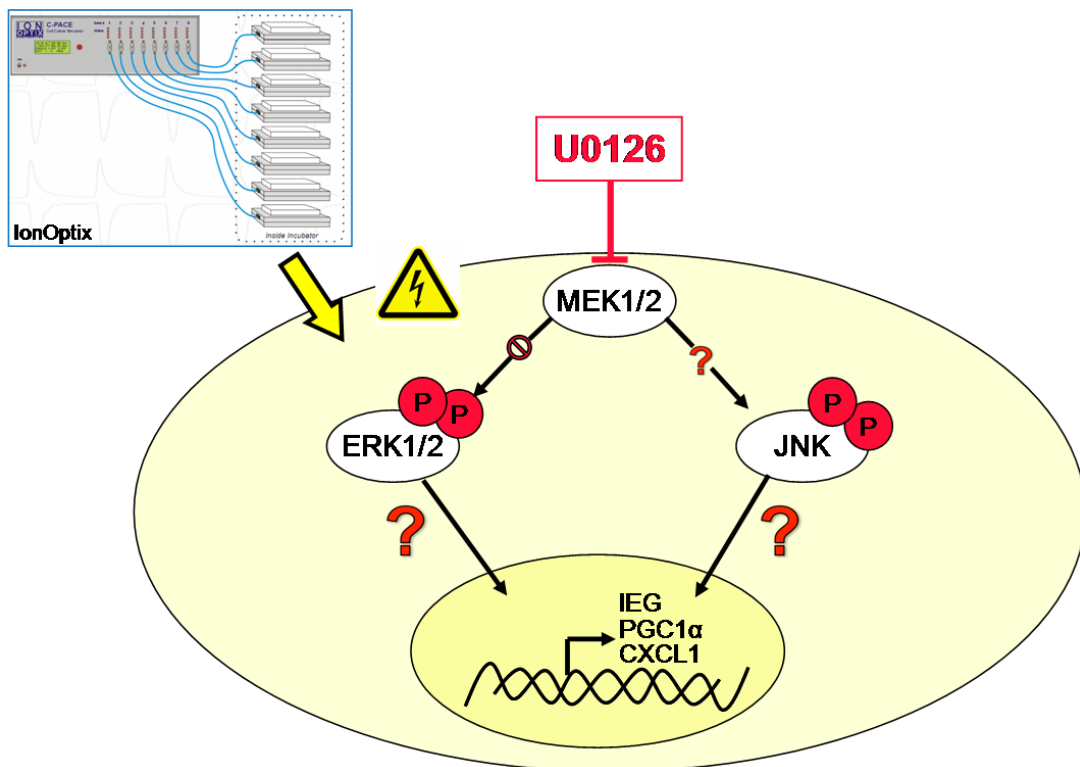


Abbildung 5.5: Modell der EP-Stimulation und U0126 Inhibition in C2C12 Zellen. C2C12 Myotuben wurden mittels Elektroden, die an einen C-PACE EP Culture Pacer (IonOptix, Dublin, Irland) angeschlossen werden, elektrisch stimuliert. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich, eine Muskelkontraktion in einem Zellsystem zu simulieren. Die Stimulation der C2C12 Zellen erfolgte für 4 h mit 14 V, 5 Hz und 2 ms.

5.5 Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 Zellyse

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und es wurden 200 µl Lysepuffer mit Phosphatase Inhibitoren pro Well einer 6-Well Zellkulturplatte zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit dem Lysepuffer bei 4°C auf einem Tischschüttler 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine einmalige Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden jeweils 40 µg der Lysate aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Lyse der Zellen wurden folgende Komponenten verwendet:

50 mM	HEPES
150 mM	NaCl
1.5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
10 %	Glycerin
1 %	Triton X-100
100 mM	NaF
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇

Tabelle 5-4: Lysepuffer

Der Lysepuffer wurde vor Verwendung mit den Phosphatase Inhibitoren versetzt. Die Phosphatase Inhibitoren wurden als 10-fache Stocklösungen bei -20°C gelagert und bei Bedarf 1:10 im Lysepuffer gelöst.

10 mM	NaF
5 mM	Natriumpyrophosphat
10 mM	Natriumorthovanadat
10 mM	β-Glycerophosphat

Tabelle 5-5: Phosphatase Inhibitoren

Die Phosphatase Inhibitoren wurden in Aqua Bidest gelöst, bei -20°C gelagert und kurz vor der Benutzung aufgetaut.

5.5.2 Nukleus / Zytosol Fraktionierung

Für die Trennung von zytosolischer und nukleärer Fraktion wurde jeweils ein EDL-Muskel bzw. ein kleines Stück Lebergewebe (à ca. 30 mg) eingesetzt. Die Trennung von Zytosol- und Nukleus Proteinen erfolgte mit dem NE-PER Nuclear Protein Extraction Kit (Thermo Scientific) und die Fraktionierung gemäß den Anleitungen des Herstellers. Zusätzlich wurde den im Kit enthaltenen Puffern CERI und NER Protease-Inhibitoren (1x cOmplete (EDTA-free, Roche Diagnostics) zugesetzt. Das gefrorene Gewebe wurde zunächst in CERI Lysepuffer in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß mit einer Stahlkugel (5 mm, Qiagen) in einem TissueLyser (Qiagen) für 2x 2 min bei einer Frequenz von 20 Hz homogenisiert. Die Apparaturblöcke des TissueLyser

wurden zuvor für ca. 30 min bei -20°C vorgekühlt. Für die Zytosol Fraktionierung wurden 200 µl CERI + 11 µl CERII Puffer eingesetzt. Nach Zugabe dieser Puffer, deren Zusammensetzung nicht bekannt war, wurde die Zellmembran zerstört und die zytosolischen Proteine freigesetzt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde die nukleäre Fraktion pelletiert und die zytosolische Fraktion als Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionstube überführt. Die bis dahin intakten Zellkerne wurden durch Zugabe des Puffers NER lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 45 min und mehrmaligem Vortexen wurde über einen weiteren Zentrifugationsschritt die nukleäre Fraktion im Überstand gewonnen und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte die Proteinbestimmung (5.5.3). Die zytosolischen Lysate wurden á 100 µg, die nukleären Lysate á 40 µg aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.5.3 Proteinbestimmung und Aufbereitung der Proben für SDS-Page

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford Methode. Diese Methode basiert auf dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, der einen Komplex mit den Proteinen in einer sauren Lösung bildet. Nach der Komplexbildung kann die Absorptionsänderung im Bereich von 470 nm bis 595 nm mit einem Spektrophotometer (Biorad, München) verfolgt werden. Die relativen Proteinkonzentrationen werden dann mit einer Rinderserumalbumin (BSA) Standardkurve bestimmt. Die Proben und BSA Standards wurden in HPLC-grade H₂O verdünnt.

Standard	BSA [µg/µl]
1	0
2	0.05
3	0.1
4	0.2
5	0.3
6	0.4
7	0.5

Tabelle 5-6: BSA Standard Konzentrationen

Die Messung der Proben und BSA Standards erfolgte als 3-fach Bestimmung. Dazu wurden die Zell- und Skelettmuskellysate 1:20 und die Leberlysate 1:200 in HPLC-grade H₂O verdünnt und je 3x10 µl in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Nach Zugabe von je 200 µl der 1:5 in VE-Wasser verdünnten Bradford Reagenz zu jeder Probe konnte die Absorptionsänderung bei

595 nm mit einem Spektrophotometer (Biorad, München) verfolgt werden. Nach der Proteinbestimmung wurden die gegebenen Proteinmengen für die SDS-PAGE mit 5x Lämmli Puffer gemixt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein SDS Gel geladen. Die exakt verwendeten Proteinmengen sind den Legenden der jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen.

1 M	Tris-HCL, pH 6.8
50 %	Glycerin
10 %	SDS
5.5 %	2-Mercaptoethanol
1 %	Bromphenolblau

Tabelle 5-7: 5x Lämmli Puffer

5.5.4 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacralamid Gel Elektrophorese)

Durch Zugabe von Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) werden Proteine negativ geladen und können so in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dafür benötigt man zunächst ein Polyacrylamidgel. Durch Variation der Dichte des Polyacrylamidgels kann man die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch das Gel beeinflussen. Proteine mit einem hohen Molekulargewicht wandern langsamer durch das Gel als Proteine mit einem niederen Molekulargewicht.

Zunächst wurden zwei vertikale Glasplatten, die durch zwei Spacer (1 mm Dicke) getrennt waren, durch ein Silikonband abgedichtet. Anschließend wurden die Komponenten für das Trenngel gemixt und zwischen die Glasplatten bis ca. 5 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen. Dann wurde bis zum Rand mit VE-Wasser aufgefüllt, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Anschließend konnte das Gel bei RT polymerisieren. Danach wurde das Wasser verworfen, die Komponenten für ein Sammelgel wurden gemixt und damit bis zum Rand der Glasplatten aufgefüllt. In das noch flüssige Gel wurde ein Probenkamm eingesetzt, der später zum Auftragen der Proben diente. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurde der Probenkamm entfernt und die Probenaschen wurden mit VE-Wasser ausgespült. Anschließend wurde das Silikonband entfernt und die Glasplatten mit den polymerisierten Gelen in einer Elektrophoresekammer für SDS-PAGE (bsb11 Biotech Service Blue) fixiert. Nach dem Auftragen der Proben sowie einem Molekulargewichtsmarker wurden die Gele über Nacht bei 50

V laufen gelassen. Am nächsten Morgen wurde die Spannung bis zum Ende der Auftrennung auf 200 V erhöht.

25 mM	Tris
300 mM	Glycin
0.1 %	SDS

Tabelle 5-8: Elektrophorese Puffer

Trenngelpuffer (pH 8.8)	Sammelgelpuffer (pH 6.8)	Ingredienzen
1.5 M	0.5 M	Tris
2 %	2 %	SDS

Tabelle 5-9: Zusammensetzung Trenngel- und Sammelgelpuffer

Trenngel (7.5 %)	Sammelgel (5 %)	Ingredienzen
20 ml	7.05	H ₂ O
10 ml	2.55	Trenngelpuffer
10 ml	1.35	Acrylamid 30% (Rotiphorese Gel 30)
66 µl	15	TEMED
270 µl	112.5	10 % APS

Tabelle 5-10: Pipettierschema für Trenngel und Sammelgel

5.5.5 Western Blot

Die Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wird bei einem Western Blot ausgenutzt, um das gewünschte Protein mittels eines spezifischen Antikörpers sichtbar und damit auswertbar zu machen. Dafür wird die noch negative Ladung der Proteine durch die SDS-PAGE genutzt, sie im Anschluss daran auf eine Nitrocellulose Membran zu übertragen. Der Transfer erfolgte halbtrocken in einer dafür vorgesehenen Western Blot-Kammer. Das Trenngel wurde dafür zwischen 2 Filterpapiere auf eine 14 cm x 16 cm große Nitrocellulose Membran gelegt. Alle Komponenten wurden vorher in Elektrophorese Puffer getränkt (Tabelle 5-8). Anschließend wurden die Luftblasen ausgerollt und die Proteine 2 h bei 180 mA transferiert.

480 mM	Tris
390 mM	Glycin
0,4 %	SDS

Tabelle 5-11: 10x Western Blot-Puffer

Der Blot-Puffer wurde als 10-facher Puffer hergestellt und vor der Verwendung in Wasser und 20 % Methanol zu einer 1-fach Lösung verdünnt.

5.5.6 Ponceaurot Färbung

Im Anschluss an den Transfer wurden die Proteine auf der Nitrocellulose Membran zur Kontrolle mit Ponceaurot angefärbt. Diese Methode ermöglichte auch ein Schneiden der Membran, um mehrere Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts gleichzeitig mit verschiedenen Antikörpern detektieren zu können.

5.5.7 Blockieren

Im Anschluss an die Ponceaurot Färbung wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch 3-maliges Inkubieren für jeweils 15 min in NET-G Puffer bei RT blockiert.

10x NET-G	1x NET-G	Ingredienzen
500 mM	50 mM	Tris
50 mM	5 mM	EDTA
1,5 M	150 mM	NaCl
2,5 %	0,25 %	Gelatine
0,5 %	0,05 %	Triton X-100

Tabelle 5-12: NET-G Blockpuffer (pH 7.4)

5.5.8 Immundetektion

Die Membranen wurden nach der Blockierung über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern, die in NET-G gelöst waren, inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte wiederum ein 3-maliger Waschschrift in NET-G für jeweils 15 min. Danach wurde die Membran mit dem gegebenen HRP-konjugierten sekundären Antikörper, der ebenfalls in NET-G verdünnt wurde,

für 45 min inkubiert. Im Anschluss folgte wieder ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 15 min in NET-G. Für die darauffolgende Visualisierung der Proteine wurde die Chemilumineszenz Methode (ECL) angewandt. Dabei katalysiert die Meerrettichperoxidase (HRP) die Oxidation von Luminol in ein Reagenz, das bei dessen Zerfall Licht absondert. Für die Detektion der Proteine wurde direkt vor der Anwendung Lösung A und Lösung B in gleichen Teilen gemischt und die Membran für ca. 1 min in dieser Lösung inkubiert. Danach wurden in einer Dunkelkammer ECL Hyperfilme auf die Membran gelegt und anschließend in einer Entwicklermaschine (Agfa Curix 60) entwickelt.

0.1 M	Tris-HCl-ultrapure, pH 9.35
0.44 mM	p-Iodphenol
0.43 mM	Luminol

Tabelle 5-13: Lösung A für ECL

0.1 M	Tris-HCl-ultrapure, pH 9.35
0.0075 %	H ₂ O ₂

Tabelle 5-14: Lösung B für ECL

5.5.9 Strippen

Nach der Detektion der spezifischen phospho-Antikörper Signale mussten die dazugehörigen Proteine als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung detektiert werden. Hierfür wurde die Membran für eine kurze Zeit in NET-G gewaschen, um Reste der ECL Lösung zu entfernen. Anschließend wurden die phospho-spezifischen Antikörper durch eine 30-minütige Inkubation der Membran in Stripping Puffer in einem Wasserbad bei 56 °C entfernt. Die Membran wurde dann 3x je 15 min in NET-G geblockt und über Nacht bei 4°C in den entsprechenden Protein-Antikörperlösungen inkubiert.

66 mM	Tris
0.5 %	2-Mercaptoethanol
2 %	SDS

Tabelle 5-15: Stripping Puffer (pH 6.8)

5.6 Molekularbiologische Methoden

5.6.1 Isolation der Gesamt-RNA

5.6.1.1 RNA Isolation aus Zellen und Lebergewebe

Die RNA aus C2C12 Zellen und aus Lebergewebe wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Hierbei wird die RNA über eine Silikamatrixsäule gebunden und nach mehreren Reinigungs- und Waschschritten in RNase-free H₂O eluiert. Dem im Kit enthaltenen RLT Lysepuffer wurde 2-Mercaptoethanol (10 µl / ml RLT) vor Gebrauch zugesetzt. Die C2C12 Zellen wurden direkt nach dem Ende der entsprechenden Stimulation mit RLT Lysepuffer lysiert. Im Falle der Leber wurden ca. 20–30 mg schwere Leberstückchen zunächst in RLT Lysepuffer in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß mit einer Stahlkugel (5 mm, Qiagen) 2x für je 2 min bei einer Frequenz von 20 Hz in einem TissueLyser (Qiagen) homogenisiert. Die anschließende Isolation der RNA erfolgte bei Zellen und Lebergewebe nach dem Protokoll des Herstellers. Zusätzlich wurde ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die RNA aus Lebergewebe wurde in 50 µl und die aus Zellen in 30 µl RNase-free H₂O eluiert.

5.6.1.2 RNA Isolation aus Muskelgewebe

Die RNA Isolation aus Skelettmuskelgewebe erfolgte mit dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit von Qiagen. Für die RNA Isolation der Soleus Muskel wurden jeweils beide Solei eingesetzt, während für die Isolation von EDL, Tibialis und Plantaris jeweils nur ein Muskel eingesetzt wurde. Dem im Kit enthaltenen RLT Lysepuffer wurde 2-Mercaptoethanol (10 µl / ml RLT) vor Gebrauch zugesetzt. Zunächst erfolgte nach Anleitung des Hersteller ein Proteinase-K Verdau für 10 min auf einem Heizblock bei 55°C. Anschließend wurde der Zelldebris durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert und der Überstand für die weitere RNA Isolation verwendet. Die anschließende Isolation der RNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zusätzlich wurde ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in 30 µl RNase-free H₂O eluiert.

5.6.1.3 RNA Isolation aus Fettgewebe

Die Isolation der Fett RNA erfolgte mit PeqGOLD TriFast (Peqlab) und anschließend mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach dem Protokoll „RNA purification for lipid tissue“. Das weiße Fettgewebe wurde zunächst gewogen und wenn nötig mit einem Skalpell zerkleinert, da

nicht mehr als 100 mg Gewebe bei der Isolation der Fett RNA eingesetzt werden sollten. Anschließend wurde 1 ml PeqGOLD TriFast zugegeben und das Fettgewebe für 2x 2 min bei einer Frequenz von 20 Hz im TissueLyser (Qiagen) homogenisiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 2.0 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Danach folgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform. Die Proben wurden 15 s geschüttelt und anschließend wieder 3 min bei RT inkubiert. Die folgende 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C trennte das Homogenisat in 3 Phasen, wobei die RNA sich in der oberen wässrigen Phase befand. Durch vorsichtiges Abnehmen dieser oberen Phase und Überführung in ein neues 2 ml Reaktionstube konnte eine weitere Aufreinigung und Isolation der RNA erreicht werden. Dafür wurde die RNA mit einem 1 V 70 % Ethanol gefällt und das Lysat in die RNeasy Silikamatrixröhrchen (Qiagen) überführt. Die weitere Isolation erfolgte nach den Anleitungen des Herstellers. Zusätzlich wurde ein DNase-Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen) durchgeführt. Die RNA wurde in 50 µl RNase-free H₂O eluiert.

5.6.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA Konzentration wurde mit einem NanoDrop™ (Spektralphotometer) bei 260 nm gemessen. Hierfür wurde 1 µl unverdünnte RNA direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Der Reinheitsgrad der RNA wird dabei über das Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm ermittelt, wobei der erwünschte Quotient für RNA bei etwa 2.0 liegen sollte.

5.6.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die RNA für die weitere Genexpressionsanalyse nutzen zu können, wurde sie in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies wurde mittels einer reversen Transkriptase und einer PCR Reaktion realisiert.

Die RT-PCR erfolgte mit dem Transcriptor First strand cDNA synthesis Kit mit Hilfe von Random Hexamer Primern (Roche Diagnostics). Hierbei wurde zunächst 1 µg der totalen RNA entsprechend mit PCR-grade H₂O auf insgesamt 11 µl verdünnt und für 10 min bei 65°C in einem Thermocycler denaturiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und 9 µl des Reaktionsmixes zugegeben (Gesamtvolumen 20 µl). Danach wurde die RNA ebenfalls in einem Thermocycler in cDNA umgeschrieben. Nach Beendigung der reversen Transkription wurde die cDNA zu je 2 µl aliquotiert, die dann weiter für die qRT-PCR Analyse verwendet wurden.

Menge [μ l]	Ingredienzen
2	Random Hexamer
2	dNTPs
4	5x Reaktionspuffer
0.5	Reverse Transkriptase
0.5	RNase-Inhibitor

Tabelle 5-16: 1x Reaktionsmix für RT-PCR

Dauer [min]	Temperatur [$^{\circ}$ C]
10	25
30	55

Tabelle 5-17: RT-PCR Bedingungen

5.6.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) ermöglicht eine Vervielfältigung der cDNA und eine gleichzeitige quantitative Bestimmung der mRNA Expressionslevel entsprechender Gene. Die qRT-PCR erfolgte hierbei nach der SYBR-Green Methode. Bei dieser Methode interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff mit der cDNA. Eine Fluoreszenzzunahme korreliert also mit einer Vervielfältigung der DNA und kann so für die Messung des Gehalts an doppelsträngiger DNA nach jedem Zyklus herangezogen werden.

Für die in dieser Arbeit vorliegenden Messungen der mRNA-Expressionslevel wurde ausschließlich der QuantiFast Sybr® Green PCR Kit in Kombination mit den QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen verwendet. Die entsprechenden Primer sind Abschnitt 4.7.3 zu entnehmen. Die Messungen erfolgten in einem LightCycler® 480 (Roche Life Science).

Menge [μ l]	Ingredienzen
2	cDNA
10	QuantiFast Reagenz
2	Quantitect Primer Mix
6	PCR-grade H ₂ O

Tabelle 5-18: 1x Reaktionsmix für QuantiTect PCR

PCR Ablauf		Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung		95	5 min
Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung	95	10 s
	Kombinierte Hybridisierung / Elongation	60	30 s
Schmelzkurve	Denaturierung	95	5 s
	Schmelzstart	60	10 s
	Graduelle Erhöhung der Temperatur auf:	98	

Tabelle 5-19: QuantiTect qRT-PCR Programm

6 Ergebnisse

6.1 Der Einfluss des Energiestatus auf eine 60-minütige Ausdauerbelastung

Während Ausdauersports wird nicht nur der Metabolismus des Skelettmuskels, sondern auch der der Leber in einem hohen Maß beeinflusst (117). Die Leber ist der wichtigste Glukoselieferant im gesamten Metabolismus und muss auch in Zeiten erhöhten Energieverbrauchs wie zum Beispiel während einer Nahrungsrestriktion oder eines Ausdauersports dem Organismus ausreichend Glukose zur Verfügung stellen. Die Leber ist dabei in der Lage, einerseits Glukose über die Glykogenspeicher freizusetzen, andererseits aber auch Glukose aus Vorläufern wie Aminosäuren, Glycerol und Laktat zu synthetisieren. Es stellt sich die Frage, inwieweit die Menge der Energiereserven, insbesondere der Glykogenspeicher, eine Rolle bei der metabolischen Antwort der Leber auf Belastungssituationen spielt. Um diese Frage beantworten zu können, ist es möglich, die Leber einer Belastungssituation wie einem 60-minütigen Ausdauerlauf auszusetzen, nachdem entweder vorher der Glykogenspeicher nahezu verbraucht wurde, wie es beispielsweise durch mehrstündige Nahrungsrestriktion erreicht wird, oder nachdem unmittelbar vor dem Ausdauerlauf eine Wiederauffüllung dieser Speicher durch Nahrungsaufnahme nach längerer Nahrungsrestriktion erfolgt.

Um dies zu realisieren, wurden 12 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse über Nacht gefastet. Ein Teil der Tiere bekam am nächsten Morgen für 6 Stunden wieder Futter (Ref), während der andere Teil ohne Nahrung verblieb (Fast). Anschließend absolvierte jeweils eine Subgruppe einen 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband (Fast/Run bzw. Ref/Run), während eine zweite Subgruppe im Käfig verblieb (Fast/Sed bzw. Ref/Sed).

6.1.1 Der Einfluss von Ausdauersport und Nahrungsrestriktion auf den Metabolismus

Um zunächst einen Einfluss von Nahrungsrestriktion und Ausdauersport auf den Metabolismus zu untersuchen, wurden mehrere Parameter in Plasma und Leber gemessen.

Die 21-stündige Nahrungsrestriktion (Fast/Sed) bewirkte eine signifikante Erniedrigung der Plasmakonzentrationen von Glukose, Insulin sowie tendenziell der Triglyzeride (TG) (Abbildung 6.1 [a], [b] und [c]), einen signifikant höheren Plasmaspiegel der freien Fettsäuren (FFA) (Abbildung 6.1 [d]) sowie höhere TG-Konzentrationen in der Leber (Abbildung 6.1 [e]) im Vergleich zu den Mäusen nach Wiederfütterung (Ref/Sed). Der 60-minütige Ausdauerlauf be-

wirkte keine Veränderung der Plasmaglukosespiegel sowohl in den Mäusen nach Nahrungsrestriktion als auch nach Wiederfütterung (Fast/Run und Ref/Run). Der Insulinspiegel nahm nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf nur in wiedergefütterten Mäusen (Ref/Run) signifikant ab (Abbildung 6.1[b]).

Der Ausdauerlauf führte zu einem signifikanten Anstieg der freien Fettsäuren (FFA) in den wiedergefütterten Mäusen (Ref/Run), wobei die Konzentration aber deutlich unter den Werten in den gefasteten Tieren (Fast/Run) blieb ($235 \pm 45 \mu\text{mol/l}$ vs. $687 \pm 48 \mu\text{mol/l}$, $p < 0.001$). Dagegen zeigten die TG in der Leber der gefasteten Mäuse nach dem Ausdauerlauf eine Tendenz zu noch höheren Werten (Abbildung 6.1 [e]).

Die Glykogenreserven in der Leber waren nach 21-stündiger Nahrungsrestriktion vollständig aufgebraucht und stiegen nach Wiederfütterung um das 200-fache auf einen durchschnittlichen Wert von $30 \pm 3 \text{ mg/g}$ Gewebe an und sanken wieder signifikant nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf auf Werte von $17 \pm 3 \text{ mg/g}$ ab (Abbildung 6.2 [a]). Im Gastrocnemius Muskel stieg der Glykogenspiegel nach Wiederfütterung nur auf das 4-fache an und betrug im Vergleich zur Leber nur $1.2 \pm 0.4 \text{ mg/g}$ Gewebe (Abbildung 6.2 [a] und [b]).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine mehrstündige Nahrungsrestriktion bereits einen so großen Effekt auf die Regulation des Glukosestoffwechsels in der Leber hat, dass dieser durch eine zusätzliche Belastungssituation nicht noch weiter ausgelenkt wird.

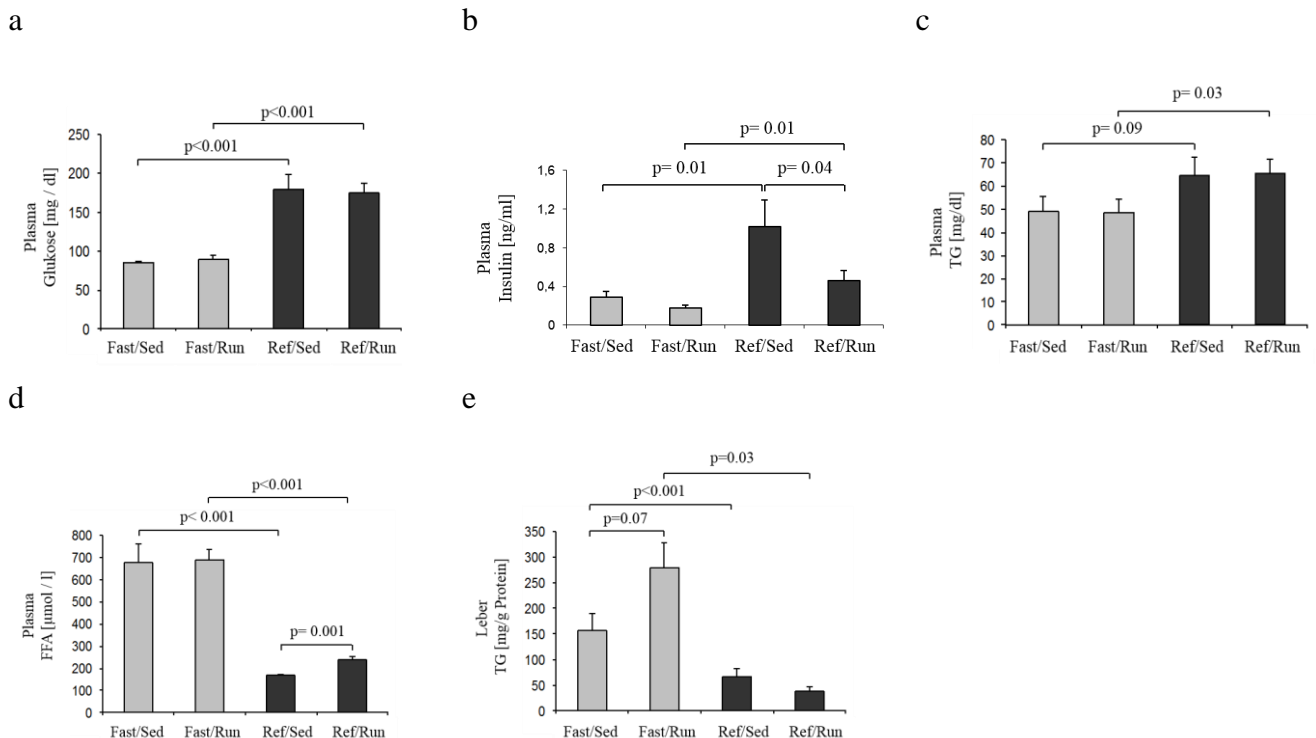
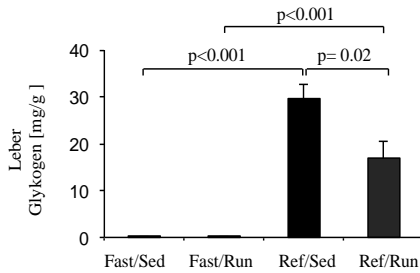


Abbildung 6.1: Metabolische Parameter in Plasma und Leber nach Ausdauersport in gefasteten bzw. wiedergefütterten Mäusen. Gezeigt sind die metabolischen Parameter von gefasteten (Fast) bzw. wiedergefütterten (Ref) Mäusen, ohne (Sed) bzw. mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf. [a] Plasma Glukose, [b] Plasma Insulin, [c] Plasma TG, [d] Plasma Freie Fettsäuren und [e] Leber TG (mg TG / g Gesamtprotein im Gewebe). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=6 Mäusen.

a



b

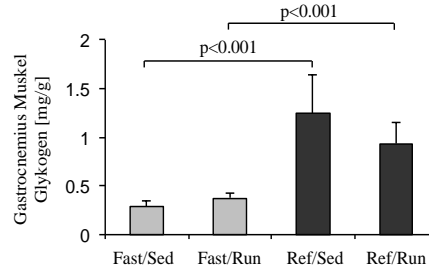


Abbildung 6.2: Nahrungsrestriktion verursacht eine vollständige Depletion der Glykogenspeicher in der Leber. Gezeigt sind die Glykogen-Spiegel [a] in der Leber und [b] im Gastrocnemius Muskel von gefasteten (Fast) bzw. wiedergefütterten (Ref) Mäusen, ohne (Sed) bzw. mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf. Glykogen-Werte sind als mg Glykogen/g eingesetztes Gewebe gezeigt (Mittelwert + SEM, n = 6 Mäuse).

6.1.2 Keine additive Wirkung von Nahrungsrestriktion und 60-minütiger Ausdauerbelastung auf die Expression von *Igfbp-1*, *Ppargc1a* und *G6pc* in Leber und Muskel

Für einen Vergleich von Nahrungsrestriktion und Wiederfütterung verbunden mit einem 60-minütigen Ausdauerlauf und deren Einfluss auf die Leber wurde die Proteinmenge von IGFBP-1 sowie die Expressionen verschiedener regulatorischer Gene des Glukosestoffwechsels der Leber analysiert.

Nach der 21-stündigen Nahrungsrestriktion war die IGFBP-1 Proteinmenge in der Leber signifikant erhöht (Abbildung 6.3 [a] und [b]), wobei ein 60-minütiger Ausdauerlauf hierauf keinen weiteren Effekt hatte. Auch die Genexpression von *G6pc* und *Ppargc1a* in der Leber war in gefasteten Mäusen im Vergleich zu den wiedergefütterten Mäusen (Ref/Sed) um das 10 bis 14-fache, die Genexpression von *Igfbp1* um das 900-fache erhöht (Abbildung 6.3 [c]-[e]). Ein 60-minütiger Ausdauerlauf resultierte hierbei nur in den wiedergefütterten Mäusen (Ref/Run) in einer signifikanten Steigerung der Genexpressionen von *Igfbp1* und *G6pc*. Die Genexpression

von *Pdk4* stieg nach Nahrungsrestriktion an und fiel nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf nur in gefasteten Mäusen wieder signifikant ab (Abbildung 6.3 [f]).

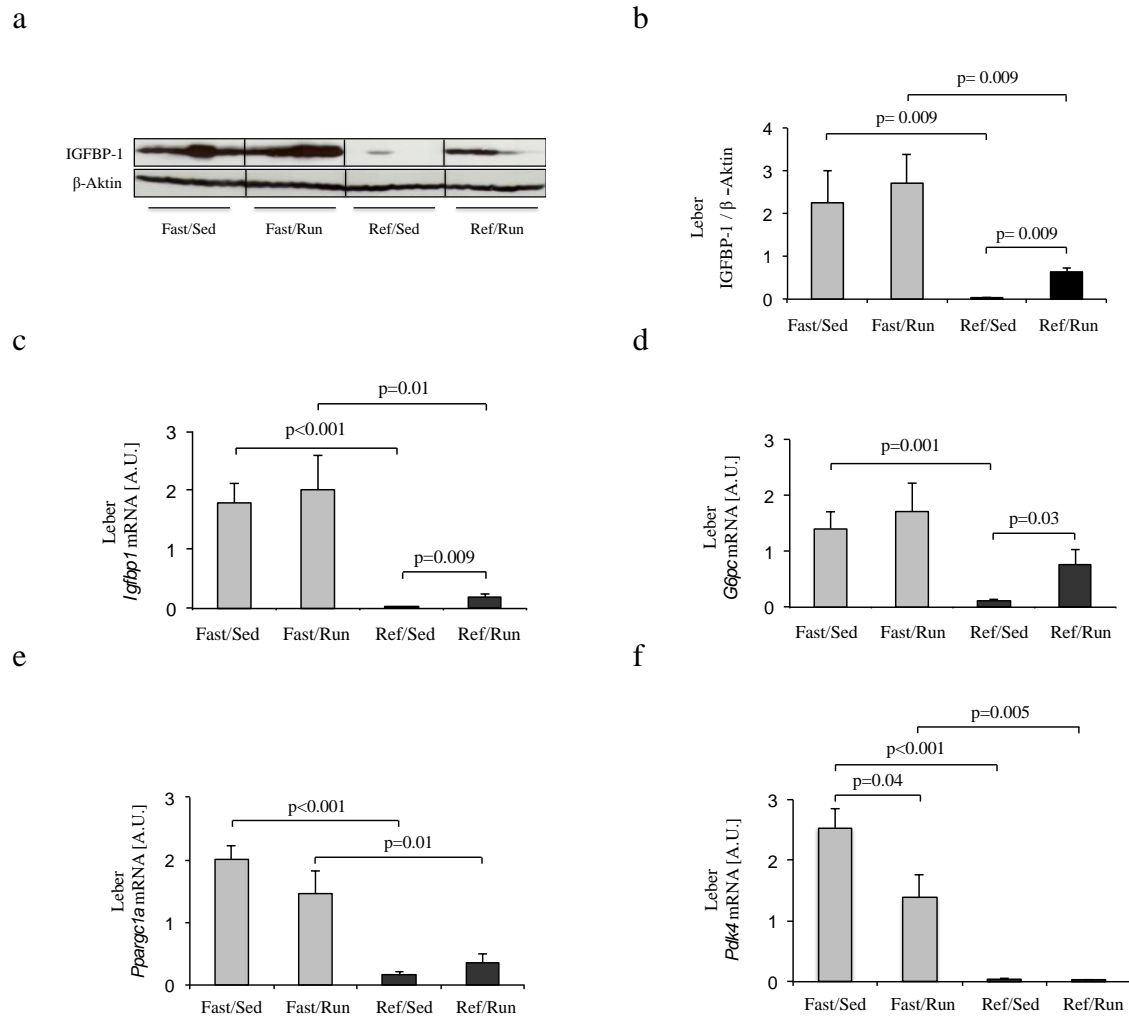


Abbildung 6.3: *Igfbp1*, *G6pc*, *Ppargc1a* und *Pdk4* sind in der Leber nach Nahrungsrestriktion signifikant erhöht. Für die Westernblot Analyse wurden je 200 μ g Protein aufgetragen. Dargestellt ist jeweils die IGFBP-1 Expression von 4 verschiedenen Mäusen pro Gruppe. Gezeigt ist [a] die IGFBP-1 Proteinexpression in Lebergewebe und [b] die densitometrische Auswertung der Proteinbanden bezogen auf β -Aktin von gefasteten (Fast) bzw. wiedergefütterten (Ref) Mäusen, ohne (Sed) bzw. mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf (Mittelwerte \pm SEM; n=8 Mäuse). Die mRNA-Expressionslevel von [c] *Igfbp1*, [d] *G6pc*, [e] *Ppargc1a* und [f] *Pdk4* in der Leber wurden durch qRT-PCR ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=6 Mäusen.

6.1.3 ERK1/2 ist nach Ausdauersport in der Leber unabhängig vom Energiestatus aktiviert

Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass die ERK1/2 MAPK während sportlicher Belastung im Muskel aktiviert wird, wobei diese Aktivierung abhängig von der Dauer und der Intensität der Belastung ist (162). Um zu klären, ob es auch in der Leber zu einer Aktivierung der ERK1/2 MAPK nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung kommt und ob diese durch den Energiestatus beeinflusst wird, wurde in Lebergewebe der gefasteten bzw. wiedergefütterten Mäuse mittels phospho-spezifischer Antikörper die Phosphorylierung von ERK1/2 nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf untersucht. In den folgenden Ergebnissen ist beispielhaft immer die p44 MAPK (ERK1) gezeigt. Nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf konnte sowohl nach Nahrungsrestriktion als auch nach Wiederfütterung eine verstärkte Phosphorylierung der ERK1/2 MAPK in der Leber detektiert werden (Abbildung 6.4), wobei sich kein signifikanter Einfluss durch den Energiestatus ergab.

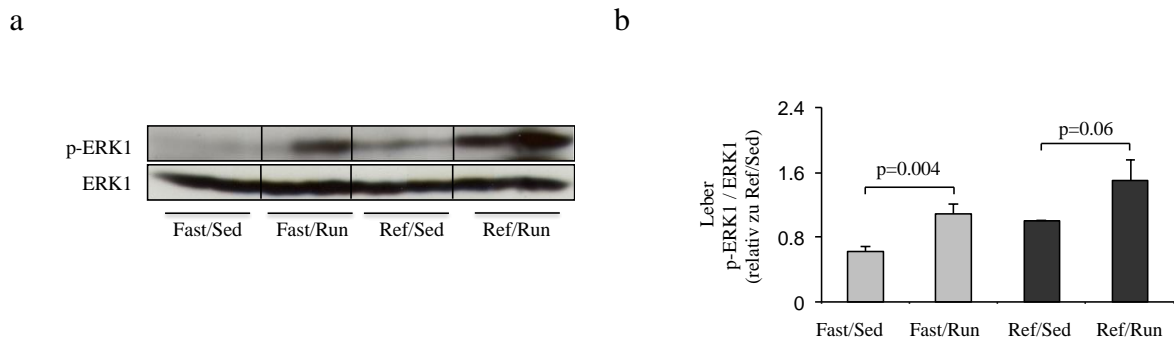


Abbildung 6.4: ERK1 ist in der Leber nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf aktiviert. Gezeigt ist [a] der Western Blot der phospho-p44 MAPK (Thr 202/Tyr204) (p-ERK1) und der dazugehörige p44 MAPK (ERK1) Reblot (aus Lebergewebe von 2 verschiedenen Mäusen pro Gruppe (es wurden je 200 µg Protein aufgetragen)). In [b] ist die densitometrische Auswertung der Banden von p-ERK1 bezogen auf ERK1 Protein gezeigt (Mittelwerte \pm SEM; n=8 Mäuse).

6.1.4 Der Einfluss der Energiereserven für die IEG Expression in der Leber nach Ausdauersport

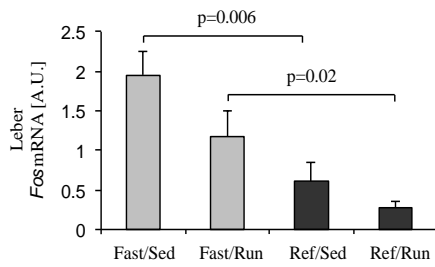
Nicht nur im Skelettmuskel, sondern auch in der Leber führt eine 60-minütige Ausdauerbelastung zu einer Induktion der IEG Expression, die wiederum mit niedrigen Plasmaglukosewerten nach dem Ausdauerlauf assoziiert ist (116, 117). Aus diesem Grund stellt sich die Frage, inwiefern eine extreme Veränderung der hepatischen Energiereserven - auf der einen Seite eine vollständige Entleerung der Glykogenspeicher und auf der anderen Seite deren Wiederauffüllung – einen Einfluss auf die IEG Expression in der Leber hat. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden mittels qRT-PCR die mRNA-Expressionslevel verschiedener bekannter IEGs in gefasteten und wiedergefütterten Mäusen gemessen.

Nach 21 Stunden Nahrungsrestriktion (Fast/Sed) war die Expression von *Fos*, *Jun*, *Gadd45g*, *Trp53* und *Fosb* in der Leber 2 bis 17-fach höher im Vergleich zu Mäusen die nach 15 Stunden Nahrungsrestriktion für 6 Stunden wieder Nahrung bekamen (Ref/Sed) (Abbildung 6.5 [a]-[e]). Ein 60-minütiger Ausdauerlauf hatte in den gefasteten Mäusen (Fast/Run) keinen weiteren Einfluss auf diese Genexpressionen. Der mRNA-Expressionslevel von *Trp53* stieg nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf in der Leber der wiedergefütterten Mäuse (Ref/Run) zwar signifikant an, betrug aber danach immer noch nur ein Drittel des *Trp53* mRNA-Expressionslevels in den gefasteten Mäusen (Fast/Run) (Abbildung 6.5 [d]). Auch die Expressionslevel von *Gadd45g* waren nach der 21-stündigen Nahrungsrestriktion und dem 60-minütigen Ausdauerlauf im Vergleich zu den wiedergefütterten Mäusen signifikant höher exprimiert (Fast/Run vs. Ref/Run: $p=0.009$; Abbildung 6.5 [c]).

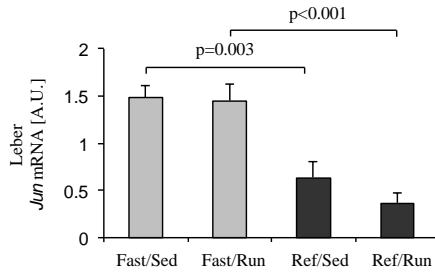
Im Soleus Muskel führte die 21-stündige Nahrungsrestriktion (Fast/Sed) per se im Gegensatz zur Leber zu keiner signifikanten Erhöhung der mRNA-Expressionslevel von *Fos* und *Jun* (Abbildung 6.5 [f]). Nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf konnte hierbei in beiden Gruppen (Fast/Run und Ref/Run) ein signifikanter Anstieg der *Fos* Expression festgestellt werden, wobei der Anstieg in den wiedergefütterten Mäusen (Ref/Run) doppelt so hoch wie in den gefasteten Mäusen (Fast/Run) war (Abbildung 6.5 [f]). Die Genexpression von *Jun* tendierte nach dem Ausdauerlauf in beiden Gruppen (Fast/Run und Ref/Run) zu einem Anstieg, welcher aber nicht signifikant war (Abbildung 6.5 [g]).

Diese Ergebnisse zeigen zwar einerseits einen Einfluss der hepatischen Energiereserven auf die IEG Expression in der Leber, andererseits aber einen deutlichen Unterschied in der Regulation der IEG Expression in Leber und Muskel.

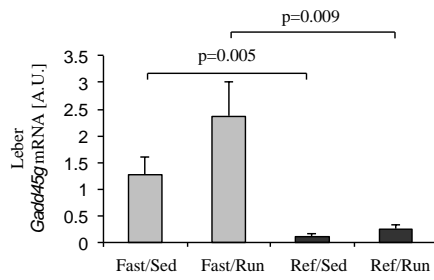
a



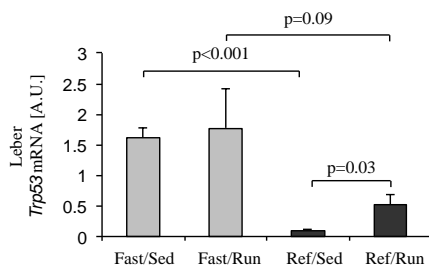
b



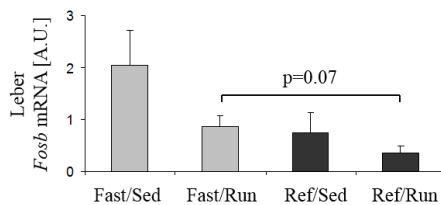
c



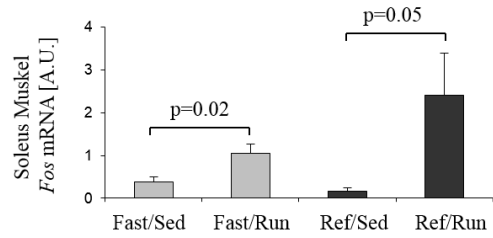
d



e



f



g

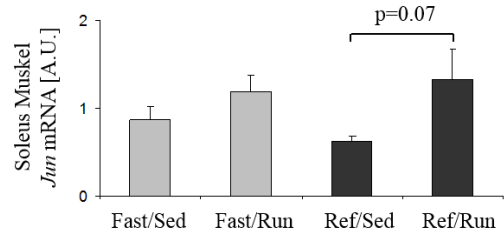


Abbildung 6.5: IEG Expression in Leber und Muskel nach Ausdauersport in gefasteten und wiedergefütterten Mäusen.

Die mRNA Expression in der Leber von [a] *Fos*, [b] *Jun*, [c], *Gadd45g* [d] *Trp53* und [e] *Fosb* sowie die mRNA Expression im Muskel von [f] *Fos* und [g] *Jun* wurde durch qRT-PCR ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=6 Mäusen.

6.2 Der Einfluss der MAPK Signalwege auf die IEG Expression in Leber und Muskel

Nicht nur in der Leber sondern auch im Skelettmuskel führt ein 60-minütiger Ausdauerlauf zu einer Aktivierung der p44/p42 MAPK (ERK1/2) (162) und zu einer erhöhten IEG Expression. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der ERK1/2 Aktivierung und der IEG Expression unter körperlicher Belastung ist für beide Gewebe bisher nicht geklärt. Um zu untersuchen ob eine Aktivierung von ERK1/2 in Leber und Skelettmuskel für die IEG Expression und die Expression von Cyto- und Chemokinen verantwortlich ist und inwieweit eine Hemmung dieser Aktivierung Auswirkungen auf den Metabolismus hat, wurde der MAPK Inhibitor U0126 in einem *in vivo* Experiment angewendet. U0126 ist ein selektiver und nicht-kompetitiver Inhibitor der dualspezifischen MAP-Kinase Kinase 1/2 (MEK1/2) (267). MEK1/2 aktiviert ERK1 und ERK2 durch eine Phosphorylierung an den zwei Aminosäureresten Thr202/Tyr204 und Thr183/Tyr185 (268). Diese Aktivierung verursacht eine Translokation der ERK MAPK in den Nukleus, was zu einer nachfolgenden Regulation verschiedener nukleärer Transkriptionsfaktoren führt (269). Wird die enzymatische Aktivität der MEK1/2 durch den Inhibitor U0126 gehemmt, ist diese nachfolgend nicht in der Lage die ERK1/2 MAPK zu phosphorylieren. Somit verhindert der Inhibitor indirekt eine Translokation von ERK1/2 in den Nukleus und hemmt die regulatorische Aktivität der ERK1/2 MAPK.

Für das Experiment wurde der Inhibitor U0126 (gelöst in 1.5% DMSO und 0.9% NaCl) männlichen C57Bl/6 Mäusen in einer Konzentration von 5 µg/g Körpergewicht (62 µmol/g) intraperitoneal appliziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden absolvierte eine Subgruppe dieser Mäuse einen 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband (U0126/Run). Eine weitere Subgruppe verblieb während dieser Zeit im Käfig (U0126/Sed). Gleichzeitig wurde C57Bl/6 Mäusen eine Kontrolllösung (1.5 % DMSO in 0.9% NaCl) appliziert. Auch von dieser Kontrollgruppe hat nach einer zweistündigen Inkubationszeit eine Subgruppe einen 60-minütigen Ausdauerlauf absolviert (Con/Run), während der andere Teil im Käfig verblieb (Con/Sed). Unmittelbar nach dem Ausdauerlauf wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet.

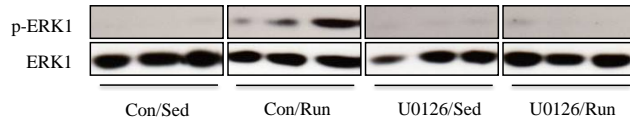
Um die durch den Ausdauersport-induzierte Genexpression auch nach einer dreistündigen Erholungsphase zu analysieren, wurde ein zweites Experiment durchgeführt, welches sich von dem oben beschriebenen dadurch unterschied, dass sich nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf noch einmal eine dreistündige Erholungsphase für die Mäuse anschloss. In diesem Experiment mussten alle Mäuse, denen U0126 appliziert wurde, einen Ausdauerlauf absolvieren (U0126/Run 3h), während innerhalb der Kontrollgruppe nur ein Teil laufen musste (Con/Run 3h) und der andere Teil im Käfig verblieb (Con/Sed 3h). Die Kontrolltiere bekamen wieder die Kontrolllösung injiziert (1.5 % DMSO in 0.9% NaCl).

6.2.1 Die Aktivierung der MAPK Signalwege nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung und der Inhibition mit U0126 in Leber und Muskel

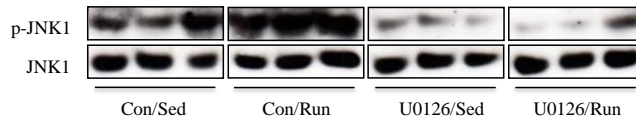
Um zunächst die Effektivität der Inhibition von U0126 auf ERK1/2 *in vivo* zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 mittels spezifischer phospho-Antikörper durch eine Western Blot-Analyse untersucht (in den folgenden Ergebnissen wird bei allen Western Blot-Analysen für die p44/p42 MAPK (ERK1/2) beispielhaft immer die p44 MAPK (ERK1) gezeigt). Darüberhinaus wurde auch die Phosphorylierung der MAPK JNK und p38 MAPK untersucht. Nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf war die ERK1/2 Phosphorylierung in der Leber der Kontrollmäuse (Con/Run) signifikant erhöht, während diese Zunahme in den Mäusen, denen U0126 appliziert wurde (U0126/Run), gehemmt war (Abbildung 6.6 [a] und [f]). Auch die Phosphorylierung der SAPK/JNK Kinase war nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf in Kontrollmäusen verstärkt (Con/Sed vs. Con/Run; $p=0.07$). Entgegen den Erwartungen war jedoch auch diese verstärkte Phosphorylierung in den Mäusen, denen U0126 appliziert wurde (U0126/Sed und U0126/Run), signifikant erniedrigt (Abbildung 6.6 [b] und [g]). Die Analyse der p38 MAPK ergab nach dem Ausdauerlauf in den Kontrollmäusen (Con/Run) eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung ($p=0.0004$) (Abbildung 6.6 [c] und [h]). Auch mit der Western Blot-Analyse konnte im EDL Muskel nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf in den Kontrollmäusen (Con/Run) tendenziell eine Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung ($p=0.09$) sowie eine signifikante Abnahme nach U0126 Applikation (U0126/Run) nachgewiesen werden (Abbildung 6.6 [d] und [i]). Die Phosphorylierung der JNK Kinase war im EDL Muskel der Kontrollmäuse nach dem Laufen verstärkt (Con/Run), jedoch hier wie schon in der Leber beobachtet signifikant niedriger bei Mäusen, denen U0126 appliziert worden war (U0126/Run) (Abbildung 6.6 [e] und [j]).

Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen auch in der Leber eine ERK1/2 Aktivierung nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf. Zum anderen zeigen sie, dass U0126 *in vivo* nicht nur die ERK1/2-, sondern auch die JNK Phosphorylierung in Leber und Skelettmuskel hemmt, während die Phosphorylierung der p38 MAPK zumindest in der Leber nicht von einer U0126 Applikation beeinflusst ist.

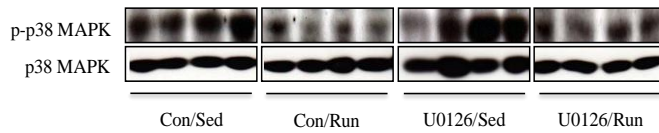
a



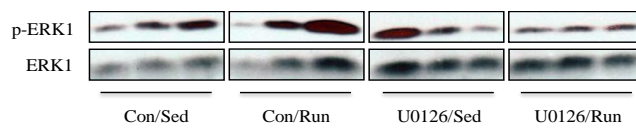
b



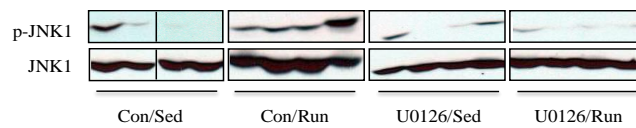
c



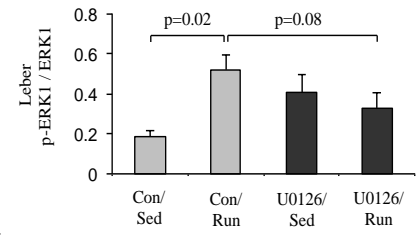
d



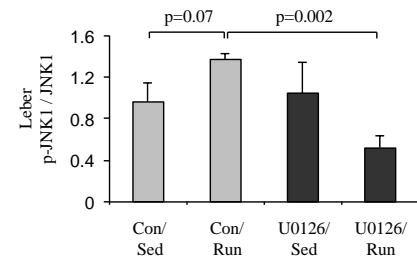
e



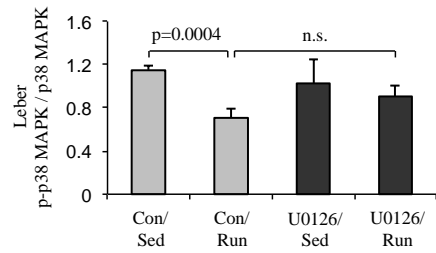
f



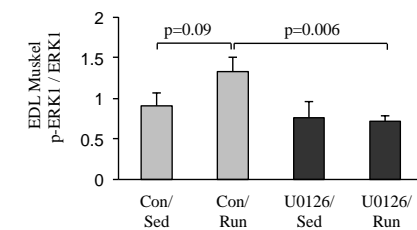
g



h



i



j

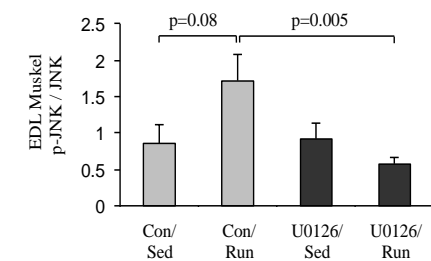


Abbildung 6.6: U0126 inhibiert ERK1 und JNK in Leber und Skelettmuskel. Gezeigt sind die Western Blot-Analysen der MAPK ERK1/2, JNK und p38 MAPK sowie die dazugehörigen densitometrischen Auswertungen der Banden in Leber und EDL Muskel in Kontrollmäusen (Con) oder U0126-applizierten Mäusen ohne (Sed) oder mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf. Es wurden jeweils 40 µg EDL Muskel Protein bzw. Leber Nukleus Extrakt aufgetragen. Die Abbildungen zeigen die Western Blots von [a] phospho-p44 MAPK (Thr202/Tyr204) (p-ERK1) und den dazugehörigen p44 MAPK (ERK1) Reblot aus Lebergewebe (von 3 verschiedenen Mäusen pro Gruppe), [b] phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (p-JNK) und den dazugehörigen SAPK/JNK Reblot aus Lebergewebe (von 3 verschiedenen Mäusen pro Gruppe), [c] phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) und den dazugehörigen p38 MAPK Reblot aus Lebergewebe (von 4 verschiedenen Mäusen pro Gruppe), [d] phospho-p44 MAPK (Thr202) (p-ERK1) und den dazugehörigen p44 MAPK Reblot aus EDL Muskelgewebe (von 3 verschiedenen Mäusen pro Gruppe) und [e] phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) und den dazugehörigen SAPK/JNK Reblot aus EDL-Muskelgewebe (n=4). Densitometrische Auswertungen der Banden von [f] phospho-ERK1 bezogen auf ERK1 Protein in der Leber, [g] phospho-SAPK/JNK bezogen auf SAPK/JNK Protein in der Leber, [h] phospho-p38 MAPK bezogen auf p38 MAPK Protein in der Leber, [i] phospho-p44 MAPK bezogen auf p44 MAPK Protein im EDL Muskel und [j] phospho-SAPK/JNK bezogen auf SAPK/JNK im EDL Muskel. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM von n=7-9 Mäusen.

6.2.2 Vergleich der IEG Genexpression nach U0126 Applikation in Leber und Skelettmuskel nach Ausdauersport

Nachdem die Wirkung des Inhibitors mittels Western Blot-Analyse in Leber und EDL Muskel analysiert worden war, stellte sich die Frage, ob die Applikation des Inhibitors eine Veränderung in der IEG Expression in Leber und Muskel zur Folge hat. Nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf war die *Fos* Expression in der Leber von Kontrollmäusen (Con/Run) 4-fach erhöht. Diese Erhöhung war durch die U0126 Applikation (U0126/Run) nicht unterdrückt (Abbildung 6.7 [a]). Auch die Genexpression von *Jun* war nach dem Ausdauerlauf in der Leber der Kontrollmäuse (Con/Run) signifikant erhöht und wies eine tendenzielle Erniedrigung in den U0126-applizierten Mäusen (U0126/Run) auf (Abbildung 6.7 [b]).

Im Soleus Muskel hingegen stieg die Genexpression von *Fos* in den Kontrollmäusen (Con/Run) nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf auf den 12-fachen mRNA Expressionslevel an, während sie bei U0126 Applikation (U0126/Run) nur auf den 4-fachen mRNA Expressionslevel anstieg und somit signifikant niedriger war (Abbildung 6.7 [c]). Die Genexpression von *Jun* stieg im Soleus Muskel der Kontrollmäuse nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf (Con/Run) auf zweifache mRNA-Expressionslevel an und war ebenfalls bei U0126 Applikation (U0126/Run) signifikant weniger exprimiert (Abbildung 6.7 [d]).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Anwendung von U0126 zwar im Skelettmuskel, nicht aber in der Leber eine signifikant niedrigere IEG Expression zur Folge hat.

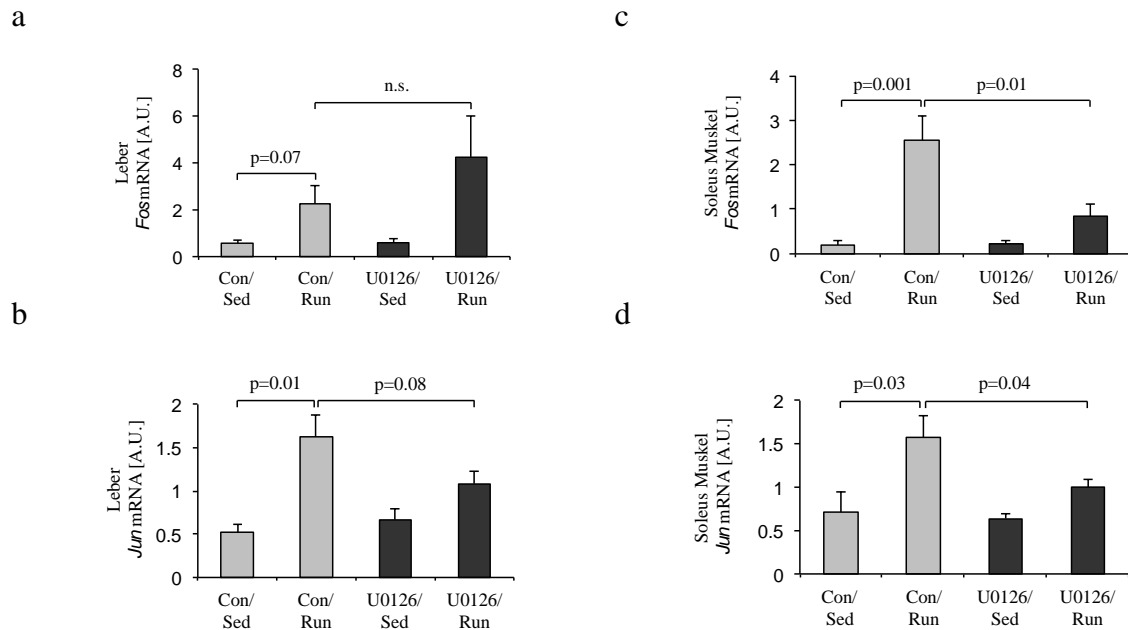


Abbildung 6.7: Vergleich der IEG Expression nach U0126 Applikation in Leber und Skelettmuskel nach Ausdauersport. Gezeigt sind verschiedene IEG-Expressionen in Kontrollmäusen (Con) oder U0126-applizierten Mäusen ohne (Sed) oder mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf Die mRNA Expressionen von [a] *Fos* in der Leber, [b] *Jun* in der Leber [c] *Fos* im Soleus Muskel und [d] *Jun* im Soleus Muskel wurden durch qRT-PCR ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=7-9 Mäusen (n.s.= nicht signifikant).

6.2.3 Eine Hemmung von ERK1/2 hat in der Leber keine weiteren Auswirkungen auf die Genexpression von *Ppargc1a*, *Pdk4* und *G6pc*

Um einen möglichen Einfluss von U0126 auf den Glukosestoffwechsel zu untersuchen, wurde in der Leber die Genexpression von *Ppargc1a* (*PGC-1 α*), *Pdk4* und *G6pc* analysiert.

Nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf waren wie erwartet diese Gene in der Leber der Kontrollmäuse (Con/Run) signifikant höher exprimiert als bei Mäusen, die nicht gelaufen waren (Con/Sed), jedoch unterschied sich diese Zunahme nicht signifikant von Mäusen, denen U0126 appliziert wurde (U0126/Run) (Abbildung 6.8 [a]-[c]).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Hemmung der ERK1/2 wie auch der JNK MAPK für die Genexpression von *Ppargc1a*, *Pdk4* und *G6pc* aber auch für die IEG Expression in der Leber nach Ausdauersport eine geringere Bedeutung hat.

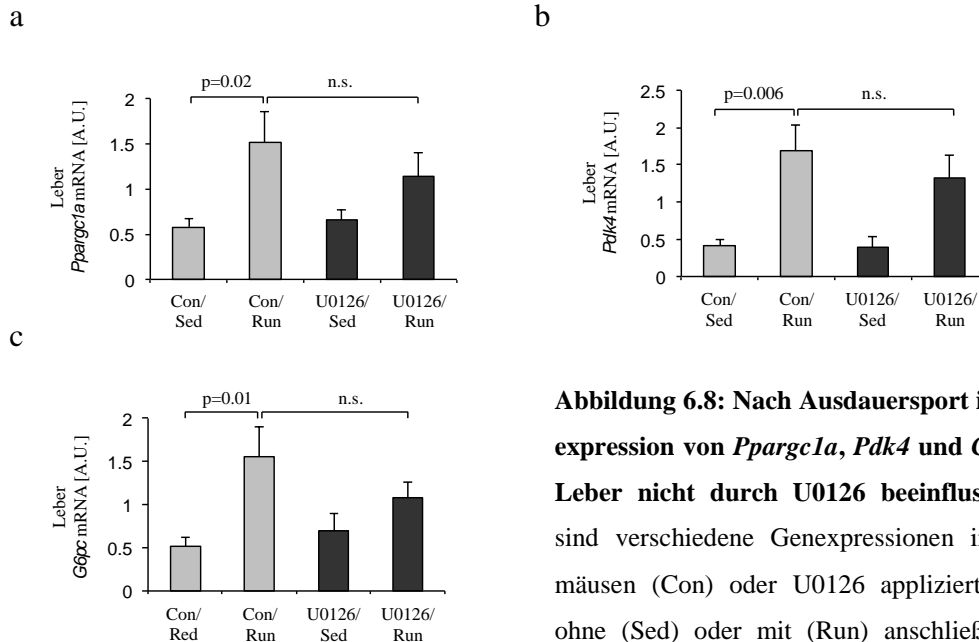


Abbildung 6.8: Nach Ausdauersport ist die Genexpression von *Ppargc1a*, *Pdk4* und *G6pc* in der Leber nicht durch U0126 beeinflusst. Gezeigt sind verschiedene Genexpressionen in Kontrollmäusen (Con) oder U0126 applizierten Mäusen ohne (Sed) oder mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf. Die mRNA Expressionen von [a] *Ppargc1a*, [b] *Pdk4* und [c] *G6pc* in der Leber wurden durch qRT-PCR ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen

6.2.4 Die Applikation von U0126 verursacht keine signifikanten Unterschiede in der metabolischen Antwort auf Ausdauersport

Um die Wirkung der U0126 Anwendung auf die metabolischen Veränderungen nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf auf den Metabolismus zu untersuchen, wurden verschiedene Parameter im Plasma, in der Leber und im Gastrocnemius Muskel gemessen.

Nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf war der Plasmaglukosespiegel sowohl in den Kontrollmäusen (Con/Run) als auch bei Mäusen, denen U0126 appliziert wurde (U0126/Run) signifikant erniedrigt (162 ± 22 (Con/Sed) vs. 114 ± 9 (Con/Run) bzw. 159 ± 10 (U0126/Sed) vs. 129 ± 6 (U0126/Run)). Nach U0126 Applikation (U0126/Sed) tendierten diese Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen (Con/Sed) zu einem höheren Plasma TG Spiegel (54 ± 4 mg/dl vs. 66 ± 5 mg/dl). Weiterhin wurde in der Leber der Kontrollmäuse (Con/Run) eine signifikante Glykogen-Abnahme (2.1 ± 0.8 mg/g (Con/Sed) vs. 0.1 ± 0.01 mg/g (Con/Run)) registriert. Insgesamt

unterschieden sich jedoch die Glykogenspiegel in beiden Gruppen (Con/Run und U0126/Run) nach dem Lauf nicht signifikant voneinander.

Darüber hinaus weisen diese Ergebnisse keine akuten Veränderungen im Metabolismus infolge der U0126 Applikation auf (Tabelle 6-1).

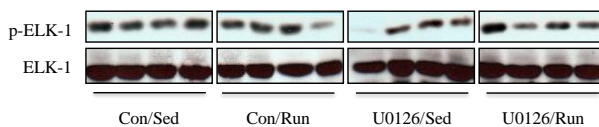
	Con/Sed	Con/Run	U0126/sed	U0126/run	Con/Sed vs. Con/Run	U0126/Sed vs. U0126/Run	Con/Sed vs. U0126/Sed	Con/Run vs. U0126/Run
Glukose [mg/dl]	162 ± 22	114 ± 9	159 ± 10	129 ± 6	p=0.001	p=0.03	n.s.	n.s.
Insulin [ng/ml]	0.9 ± 0.6	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.06	0.2 ± 0.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Plasma FFA [µmol/l]	517 ± 64	708 ± 130	736 ± 178	693 ± 124	n.s.	n.s.	p=0.08	n.s.
Plasma TG [mg/dl]	54 ± 4	86 ± 19	66 ± 5	64 ± 6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Leber Glykogen [mg/g]	2.1 ± 0.8	0.1 ± 0.01	2 ± 0.8	1 ± 0.8	p=0.02	n.s.	n.s.	n.s.
Muskel Glykogen [mg/g]	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Leber TG [mg/g]	41 ± 11	51 ± 14	30 ± 7	46 ± 9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 6-1: Die Applikation von U0126 verursacht keine signifikanten Unterschiede in der metabolischen Antwort auf Ausdauersport. Gezeigt sind verschiedene metabolische Parameter in Plasma, Leber und Gastrocnemius Muskel von Kontrollmäusen (Con) oder U0126 applizierten Mäusen (U0126) ohne (Sed) oder mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf. Der Glykogengehalt in Leber und Muskel ist jeweils in mg Glykogen/g Gewebe angegeben. Die Triglyzeride (TG) in der Leber sind in mg Triglyzeride/ g Gesamtprotein im Gewebe angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von n=7-9 Mäusen sowie die signifikanten Unterschiede der einzelnen Gruppen im Vergleich (n.s.= nicht signifikant).

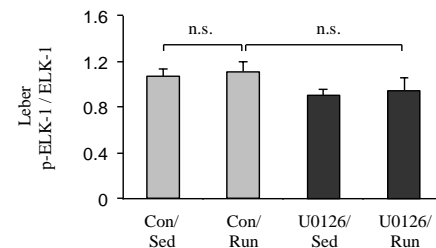
6.2.5 Die Phosphorylierung von ELK-1 ist nach U0126 Applikation nur im Muskel erniedrigt

ELK-1 gehört zur Familie der ETS Transkriptionsfaktoren (164). Die transkriptionelle Aktivität von ELK-1 ist abhängig von dessen Phosphorylierung, die wiederum von den MAPK reguliert wird. Eine Phosphorylierung von ELK-1 wird nicht nur durch die Aktivierung von ERK1/2 (225, 230), sondern auch durch die Aktivierung von JNK induziert (227). Eine ELK-1 Aktivierung führt wiederum zu einer Induktion der *Fos* Genexpression (227). Inwieweit nun eine Inhibition der MAPK mit U0126 auch eine Hemmung der Phosphorylierung von ELK-1 verursacht, wurde mittels phospho-spezifischer Antikörper durch Western Blot-Analyse überprüft. Die 60-minütige Ausdauerbelastung verursachte weder in der Leber noch im EDL Muskel der Kontrollmäuse eine Zunahme der Phosphorylierung von ELK-1 (Abbildung 6.9 [a]-[d]). Die Phosphorylierung von ELK-1 in der Leber war nicht von der U0126 Applikation beeinflusst. Hingegen war im EDL Muskel die Phosphorylierung nach der U0126 Applikation deutlich geringer (Con/Sed vs. U0126/Sed: $p=0.01$) (Abbildung 6.9 [b] und [d]). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich kein Hinweis darauf, dass die Aktivierung von ELK-1 an der induzierten *Fos* Expression in Leber und Muskel nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf beteiligt ist.

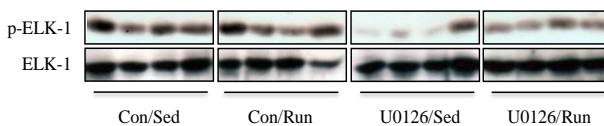
a



c



b



d

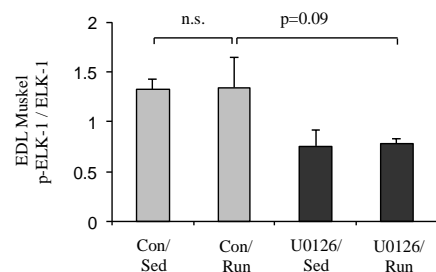


Abbildung 6.9: Die Phosphorylierung von ELK-1 ist infolge einer Hemmung von ERK1/2 nur im Muskel erniedrigt. Die Abbildungen zeigen Western Blot-Analysen von Kontrollmäusen (Con) oder U0126 applizierten Mäusen (U0126), ohne (Sed) oder mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf. Gezeigt sind die Western Blots von [a] phospho-ELK-1 (Ser383) und ELK-1 Reblot in der Leber und [b] phospho-ELK-1 (Ser383) und ELK-1 Reblot im EDL Muskel (4 verschiedene Mäuse pro Gruppe). In [c] und [d] sind die jeweiligen densitometrischen Auswertungen der Banden (phospho-ELK-1 bezogen auf ELK-1 Protein) zu sehen (Mittelwerte \pm SEM, n=7 Mäuse) (n.s.= nicht signifikant)

6.3 Die IEG Genexpression infolge einer Deaktivierung von ERK1/2 nach Ausdauersport mit dreistündiger Erholungsphase in Leber und Muskel

Ppargc1a und auch andere Gene werden im Skelettmuskel nach Ausdauersport erst nach einer dreistündigen Erholungsphase vermehrt exprimiert (130, 270, 271). Aus diesem Grund wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, welches sich von dem vorhergehenden allein darin unterscheidet, dass sich an den 60-minütigen Ausdauerlauf eine dreistündige Erholungsphase anschloss.

Anschließend wurden die Genexpressionslevel von *Ppargc1a* (PGC-1 α), *Cxcl1*, *Gadd45b*, *Junb* und *Nr4a3* im Soleus Muskel gemessen. Alle Gene waren nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf und der anschließenden dreistündigen Erholungsphase in den Kontrollmäusen signifikant erhöht. Der Anstieg der *Ppargc1a* und *Cxcl1* Expressionslevel war in U0126 applizierten Mäusen nach dem Ausdauerlauf deutlich reduziert (Abbildung 6.10 [a] und [b]). Auch die Expression von *Cxcl1* wies in den Kontrollmäusen nach dem Ausdauerlauf (Con/Run) einen zweifach höheren mRNA-Spiegel als in U0126 applizierten Mäusen (U0126/Run) auf (2.0 ± 0.5 A.U. vs. 1.0 ± 0.2 A.U.) (Abbildung 6.10 [b]). Die mRNA-Expressionslevel von *Gadd45b*, *Junb* und *Nr4a3*, die ebenfalls nach dem Ausdauerlauf in den Kontrollmäusen erhöht (Con/Run) waren, wurden durch die Applikation von U0126 nicht signifikant erniedrigt (U0126/Run) (Abbildung 6.10 [c], [d] und [e]). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die Anwendung des Inhibitors U0126 und die dadurch erfolgte Hemmung der MAPK zu einem geringeren Anstieg der Genexpression von IEGs und *Ppargc1a* im Skelettmuskel nach einer Ausdauerbelastung führt. Da der Inhibitor sowohl die Phosphorylierung von ERK1/2 als auch von JNK beeinflusst hat, ist die Rolle der einzelnen MAPK hierbei nicht geklärt.

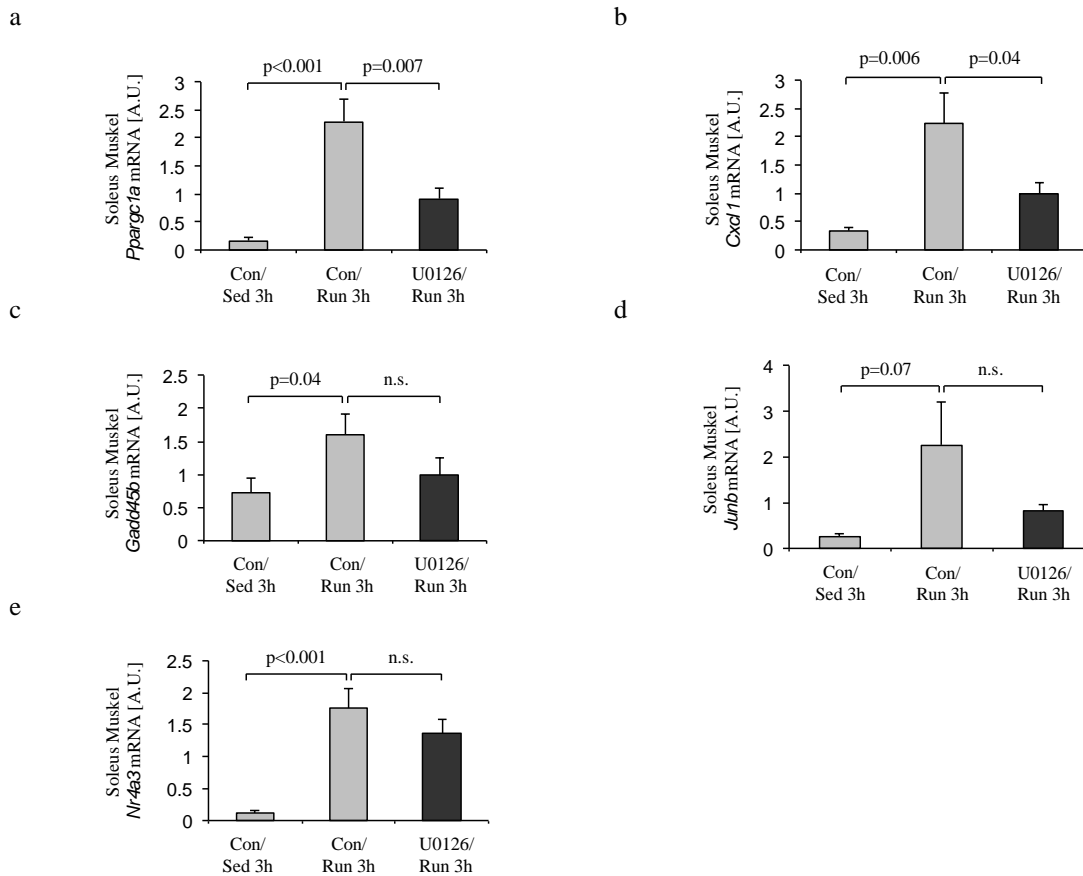


Abbildung 6.10: *Pparg1a* und *Cxcl1* sind im Muskel infolge einer Deaktivierung von ERK1/2 nach Ausdauer-sport und dreistündiger Erholungsphase signifikant erniedrigt. Gezeigt sind die durch qRT-PCR ermittelten mRNA-Expressionslevel von [a] *Pparg1a*, [b] *Cxcl1*, [c] *Gadd45g*, [d] *Junb* und [e] *Nr4a3* im Soleus Muskel von Kontrollmäusen bzw. U0126 applizierten Mäusen mit (Run) bzw. ohne (Sed) 60-minütigen Ausdauerlauf und anschließender dreistündiger Erholungsphase (Run 3h). Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=7-8$ Mäusen (n.s.= nicht signifikant).

6.3.1 Der Einfluss einer U0126 Applikation nach Ausdauer-sport und anschließender dreistündiger Erholungsphase auf den Metabolismus

Um die Auswirkungen des Inhibitors U0126 nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf mit anschließender dreistündiger Erholungsphase auf den Metabolismus zu prüfen, wurden mehrere metabolische Parameter wie Glukose, Insulin und freie Fettsäuren im Plasma (FFA), Plasma- und Leber TG sowie der Glykogengehalt in Leber und Gastrocnemius Muskel gemessen.

Der TG Gehalt in der Leber war nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf und einer dreistündigen Erholungsphase in den Kontrollmäusen (Con/Run) signifikant erhöht, während die U0126 Applikation in einem signifikant niedrigeren Anstieg dieser TG resultierte (27 ± 2 mg/g vs. 19 ± 3

mg/g) (Tabelle 6-2). Bis auf die Leber TG verursachte weder der Ausdauerlauf noch die U0126 Applikation Unterschiede bei allen anderen gemessenen Parametern. Daraus kann man schlussfolgern, dass zumindest im Plasma und im Skelettmuskel eine Hemmung von ERK1/2 durch U0126 drei Stunden nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung keine entscheidenden metabolischen Veränderungen verursacht.

	Con/Sed 3h	Con/Run 3h	U0126/ Run 3h	Con/Sed 3h vs. Con/Run 3h	Con/Run 3h vs. U0126/Run 3h
Glukose mg/dl	151±6	164±5	155±6	n.s.	n.s.
Insulin ng/ml	1.2±0.5	1.1±0.4	1.5±0.5	n.s.	n.s.
Plasma TG mg/dl	57±6	54±4	47±3	n.s.	n.s.
Plasma FFA µmol/l	301±53	378±115	274±29	n.s.	n.s.
Leber Glykogen	28±5	26±2	23±2	n.s.	n.s.
Muskel Glykogen	2.7±0.2	2.6±0.3	2.6±0.2	n.s.	n.s.
Leber TG mg/g	14±2	27±2	19±3	p<0.001	p=0.04

Tabelle 6-2: Infolge einer Deaktivierung sind in der Leber nach Ausdauersport und dreistündiger Erholungsphase die Triglyzeride signifikant erhöht. Gezeigt sind verschiedene metabolische Parameter in Plasma, Leber und Gastrocnemius Muskel von Kontrollmäusen (Con) oder U0126 applizierten Mäusen (U0126) ohne (Sed) oder mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf. Der Glykogengehalt in Leber und Muskel ist jeweils in mg Glykogen/g Gewebe angegeben. Die TG in der Leber sind in mg TG/ g Gesamtprotein im Gewebe angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von n=7-8 Mäusen sowie die signifikanten Unterschiede der einzelnen Gruppen im Vergleich (n.s.= nicht signifikant).

6.4 Die Anwendung des Inhibitors U0126 in einem ‚*In vitro* Exercise Modell‘

Um die Hemmung der Genexpression von *Cxcl1* und *Ppargc1a* im Soleus Muskel nach einer Inhibition mit U0126 *in vivo* auch *in vitro* zu überprüfen und um analysieren zu können, ob die Hemmung der ERK1/2 Aktivität oder die Hemmung der JNK Aktivität durch U0126 für die verminderte Genexpression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* im Skelettmuskel verantwortlich ist, wurde der Inhibitor U0126 in einem ‚*in vitro* Exercise Modell‘ angewandt. Für die Simulation der Ausdauerbelastung in einem *in vitro* Modell wurde das C-PACE EP System von IonOptix (Dublin, Irland) verwendet. Hierbei werden die Zellen mittels einer elektrischen Spannung und spezieller Elektroden zur Kontraktion angeregt.

Zunächst wurden ausdifferenzierte C2C12 (Mausmuskel-) Zellen (Myotuben) entweder mit DMSO (0.1 %) oder mit U0126 (10 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für 4 Stunden EP-stimuliert (EPS 4h). Anschließend wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK mittels Western Blot-Analyse untersucht sowie die Genexpression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* mittels qRT-PCR gemessen.

6.4.1 Keine Hemmung der Genexpression von PGC1 α und CXCL1 nach EP-Stimulation durch Inhibition der ERK1/2 Aktivität

Die Vorinkubation mit U0126 führte zu einer deutlichen Hemmung der Phosphorylierung von ERK1, sowohl nach EP-Stimulation (U0126/EPS 4h) als auch in den Kontrollzellen (Con/EPS 4h) (Abbildung 6.11 [a]). Die Phosphorylierung von JNK war dagegen nach der 4-stündigen EP-Stimulation in den Kontrollzellen (Con/EPS 4h) sowie nach der U0126 Inhibition (U0126/EPS 4h) deutlich verstärkt (Abbildung 6.11 [b]). Die Expressionsanalyse wies in den Kontrollzellen eine signifikante Zunahme der Expression von *Ppargc1a* nach einer 4-stündigen EP-Stimulation auf (Con/EPS 4h, $p=0.02$), wobei diese Expression im Vergleich zu den U0126 behandelten Zellen (U0126/EPS 4h) signifikant stärker ausfiel (Con/EPS 4h vs. U0126/EPS 4h: $p=0.007$) (Abbildung 6.11 [c]). Auch die *Cxcl1* Expression war in den Kontrollzellen nach 4-stündiger EP-Stimulation signifikant erhöht (Con/EPS 4h) ($p<0.001$) und zeigte eine nochmals verstärkte Zunahme der mRNA-Expressionslevel nach U0126 Applikation (Con/EPS 4h vs. U0126/EPS 4h: $p<0.001$) (Abbildung 6.11 [d]). Diese Ergebnisse belegen, dass eine Hemmung der ERK1/2 Aktivität durch U0126 bei Nichtbeeinflussung von JNK die Genexpression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* im ‚*in vitro* Exercise Modell‘ nicht unterdrückt.

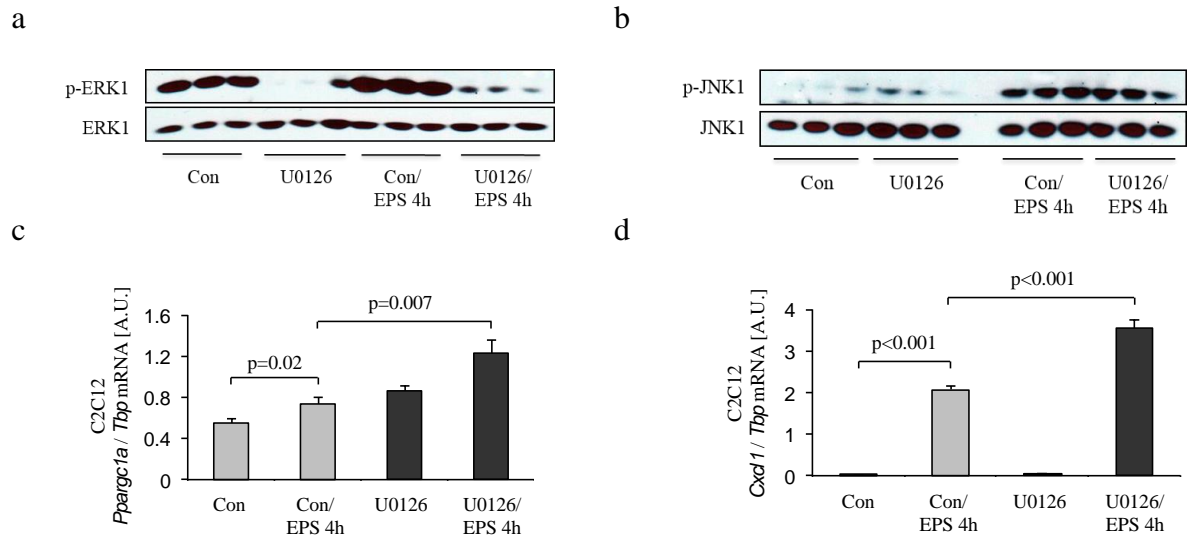


Abbildung 6.11: U0126 inhibiert *in vitro* nicht die EPS-induzierte Genexpression von *Pparg1a* und *Cxcl1*. Differenzierte C2C12 Zellen wurden mit U0126 stimuliert (10 μ M, 30 min Präinkubation) und anschließend für 4 Stunden mit EP stimuliert (EPS 4h). Es wurden jeweils 40 μ g Protein auf ein SDS Gel aufgetragen. Gezeigt sind die Western Blots von [a] phospho-p44 MAPK (Thr 202) (p-ERK1) und der dazugehörige p44 MAPK (ERK1) Reblot (von 3 verschiedenen Proben pro Gruppe) und [b] phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (p-JNK) und der dazugehörige SAPK/JNK Reblot (von 3 verschiedenen Proben pro Gruppe) Die m-RNA Expressionslevel von [c] *Pparg1a* und [d] *Cxcl1* wurden durch q-RT-PCR ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=6 Proben.

Da die Western Blot-Analyse *in vivo* im EDL Muskel eine Abnahme der ELK-1 Phosphorylierung zeigte (Abbildung 6.9), wurde diese ebenfalls in C2C12 Zellen nach U0126 Applikation und 4-stündiger EP-Stimulation untersucht. Der Effekt von U0126 auf die ELK-1 Phosphorylierung war hierbei jedoch deutlich geringer ausgeprägt als *in vivo*.

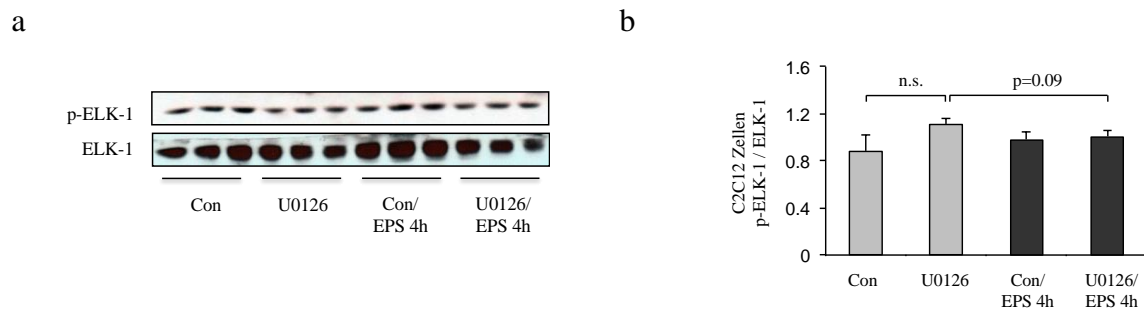


Abbildung 6.12: Die Phosphorylierung von ELK-1 ist nach einer 4-stündigen EP-Stimulation infolge der U0126 Applikation in C2C12 Zellen tendenziell erniedrigt. Differenzierte C2C12 Zellen wurden mit U0126 stimuliert (10 μ M, 30 min Präinkubation) und anschließend für 4 Stunden mit EP stimuliert (EPS 4h). Es wurden jeweils 40 μ g Protein pro SDS Gel aufgetragen. Gezeigt ist [a] der Western Blot von phospho-ELK-1 (Ser383) sowie der dazugehörige ELK-1 Reblot in differenzierten C2C12 Zellen. (von 3 verschiedenen Proben pro Gruppe) und [b] die densitometrische Auswertung der Banden von p-ELK-1 bezogen auf ELK-1 Protein in differenzierten C2C12 Zellen ohne (Con) oder mit U0126 Applikation, bzw. und ohne oder mit jeweiliger 4-stündiger EP-Stimulation (EPS). Gezeigt sind die Mittelwerte von n=6 Proben (n.s. = nicht signifikant).

6.4.2 U0126 und PD98059, jedoch nicht PD184352 aktivieren die AMPK

Das unerwartete Ergebnis, nach dem die EPS-induzierte Zunahme (Con/EPS 4h) der Expression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* nach Applikation von U0126 (U0126/EPS 4h) in den C2C12 Zellen nochmals verstärkt wird (Abbildung 6.11 [c] und [d]), könnte auf einer Interaktion dieses Inhibitors mit der AMPK beruhen. Die Inhibitoren U0126 und PD98059 (ebenfalls ein MEK Inhibitor) führen *in vitro* zu einer verstärkten Phosphorylierung der AMPK, während PD184352, ein weiterer MEK1/2 Inhibitor, die AMPK Aktivität nicht beeinflussen soll (272). Die *Ppargc1a* Expression kann unter anderem auch durch eine Aktivierung der AMPK induziert werden (150). Sollte der Inhibitor U0126 (sowie PD98059) die AMPK per se aktivieren, könnte dies auch durch die Applikation des Inhibitors allein zu einer Induktion der *Ppargc1a* Expression führen, was eventuell ihren signifikanten Anstieg in den U0126 applizierten C2C12 Zellen erklären würde (Abbildung 6.11 [c]). Um dies zu überprüfen wurden zunächst neben der U0126 Applikation auch C2C12 Zellen entweder mit PD98059 (50 μ M) oder mit PD184352 (1 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend für 4 Stunden EP-stimuliert. Anschließend folgte eine Analyse der AMPK Phosphorylierung mittels Western Blot. Diese ergab eine sichtbare Verstärkung der AMPK Phosphorylierung nach U0126 bzw. PD98059, nicht aber nach Applikation von PD184352 im Vergleich zu den Kontrollen (Con). Eine 4-stündige EP-Stimulation resultierte in einer verstärkten AMPK Phosphorylierung (Con/EPS 4h), wobei diese auch hier nach der U0126 und der PD98059, nicht aber nach der PD184352 Applikation nochmals verstärkt war (Abbildung 6.13 [a]-[c]).

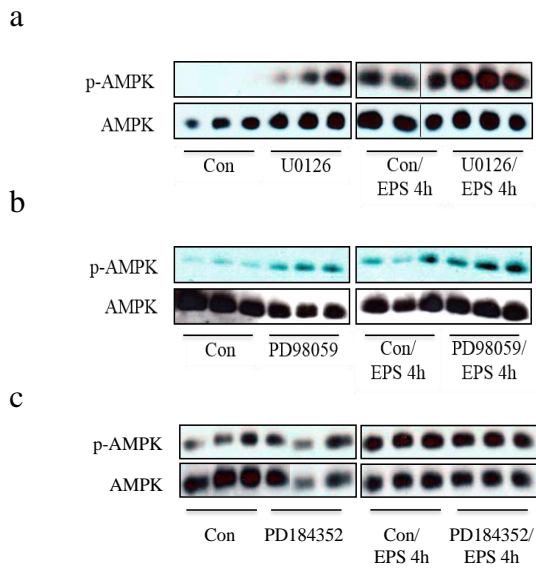


Abbildung 6.13: Die Phosphorylierung von AMPK wird durch die Applikation von U0126 und PD98059 in C2C12 Zellen verstärkt. Differenzierte C2C12 Zellen wurden entweder mit U0126 (10 μ M), mit PD98059 (50 μ M) oder mit PD184352 (1 μ M) stimuliert (jeweils mit 30 min Präinkubation) und anschließend für 4h mit EP stimuliert (EPS 4h). Es wurden jeweils 40 μ g Protein pro SDS Gel aufgetragen. Gezeigt sind die Western Blots von phospho-AMPK α (Thr172) und die dazugehörigen AMPK Protein Reblots nach [a] U0126 Applikation, [b] PD98059 Applikation oder [c] PD184352 Applikation von jeweils 3 unterschiedlichen Proben pro Gruppe.

6.4.3 Auch PD184352 hemmt nicht die Genexpression von Ppargc1a und Cxcl1

Aufgrund der nachgewiesenen Beeinflussung der AMPK durch den Inhibitor U0126, die *in vitro* zu ihrer verstärkten Phosphorylierung führt, was wiederum eine gesteigerte *Ppargc1a* Expression zur Folge haben kann, wurde die Hemmung der ERK1/2 Aktivität in dem ‚*in vitro* Exercise Modell‘ wiederholt. Anstelle des Inhibitors U0126 wurden die C2C12 Zellen mit PD184352 (1 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für 4 Stunden EP-stimuliert. Nach einer 4-stündigen EP-Stimulation war die ERK1/2 Phosphorylierung in den PD184352 applizierten Zellen (PD184352/ EPS 4h) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Con/EPS 4h) sichtbar vermindert (Abbildung 6.14 [a]). Die Phosphorylierung von JNK zeigte eine Zunahme nach 4-stündiger EP-Stimulation, war aber nicht durch die PD184352 Applikation beeinflusst (Abbildung 6.14 [b]). Die qRT-PCR Analyse ergab allerdings nach PD184352 Applikation auch hier keine Reduktion der mRNA-Expressionslevel von *Ppargc1a* (Abbildung 6.14 [c]) und *Cxcl1* nach EP-Stimulation, sondern eine signifikante Zunahme (Abbildung 6.14 [d]).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass eine Hemmung der Aktivität von ERK1/2 durch eine MEK1 Inhibition mit U0126 oder mit PD184352 nicht zu einer verminderten Genexpression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* führt.

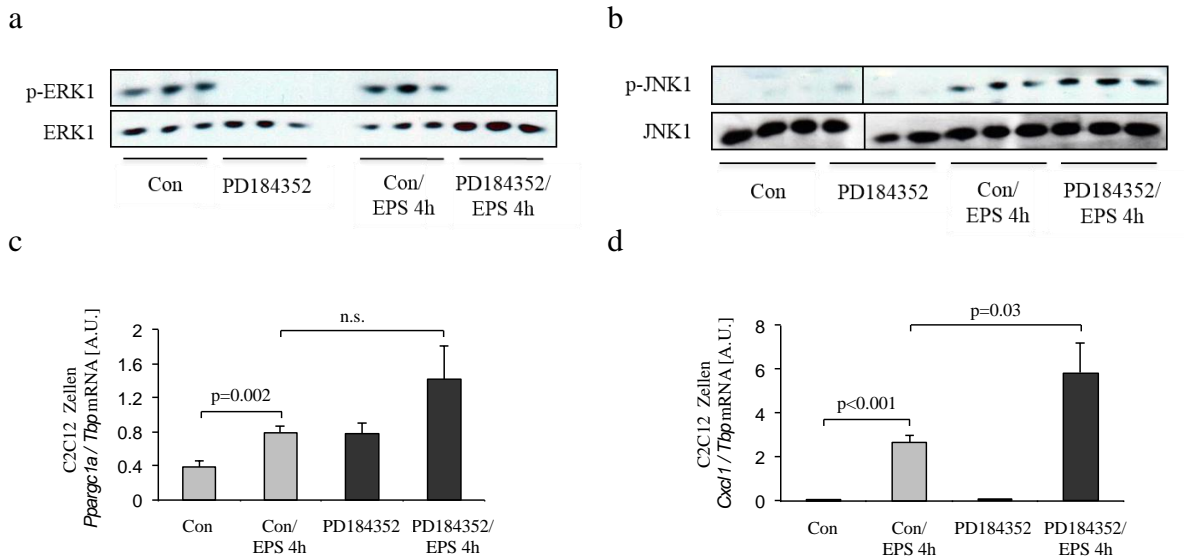


Abbildung 6.14: Keine verminderte Genexpression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* nach Inhibition der ERK1/2 Aktivität mit PD184352. Differenzierte C2C12 Zellen wurden mit PD184352 vorinkubiert (1 μ M, 30 min Präinkubation) und anschließend für 4 Stunden mit EP stimuliert (EPS 4h). Es wurden jeweils 40 μ g Protein auf ein SDS Gel aufgetragen. Gezeigt sind die Western Blots von [a] phospho-p44 MAPK (Thr202) (p-ERK1) und der dazugehörige ERK1 Reblot sowie [b] phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) und der dazugehörige SAPK/JNK Reblot. Die mRNA-Expressionslevel von [c] *Ppargc1a* und [d] *Cxcl1* wurden durch q-RT-PCR ermittelt. Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=6 Proben (n.s. = nicht signifikant).

6.4.4 Eine Herunterregulierung von ERK2 mittels siRNA Transfektion führt ebenfalls nicht zu einer Hemmung der *Cxcl1* Expression

Da eine Hemmung der ERK1/2 MAPK durch die MEK1 Inhibitoren U0126 und PD184352 nicht zu einer verminderten Expression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* nach EP-Stimulation führte und ein Einfluss der ERK1/2 MAPK auf diese Genexpressionen ausgeschlossen werden sollte, wurde versucht, die ERK1/2 Expression in C2C12 Zellen mittels Transfektion von siRNA Oligonucleotiden gegen ERK1/2 zu reduzieren. Dafür wurden spezifische siRNAs (MAPK3 (ERK1) und MAPK3 (ERK2) siRNA) verwendet. Eine Kontrollgruppe wurde gleichzeitig mit einer Luciferase siRNA transfiziert (Con). Anschließend wurden die Zellen wie auch schon in den vorangegangenen Experimenten für vier Stunden EP-stimuliert (EPS 4h). Die ERK1/2 Protein Western Blot-Analyse nach der siRNA Transfektion zeigte eine nur geringe Herunterregulierung der ERK1/2 Kinase (Abbildung 6.15 [a]), wobei insbesondere kein Effekt auf die Expression der ERK1 zu erkennen war. Die Western Blot-Analyse ergab keine

Beeinflussung der JNK Phosphorylierung durch die ERK1/2 siRNA Transfektion (Abbildung 6.15 [b]). Die Expression von *Cxcl1* wurde nicht von diesem partiellen *knockdown* von ERK1/2 beeinflusst (Abbildung 6.15 [c]). Die siRNA Transfektion ergab daher keine weiteren Aufschlüsse zur Rolle von ERK1/2 bei der EP-stimulierten Genexpression in den C2C12 Zellen.

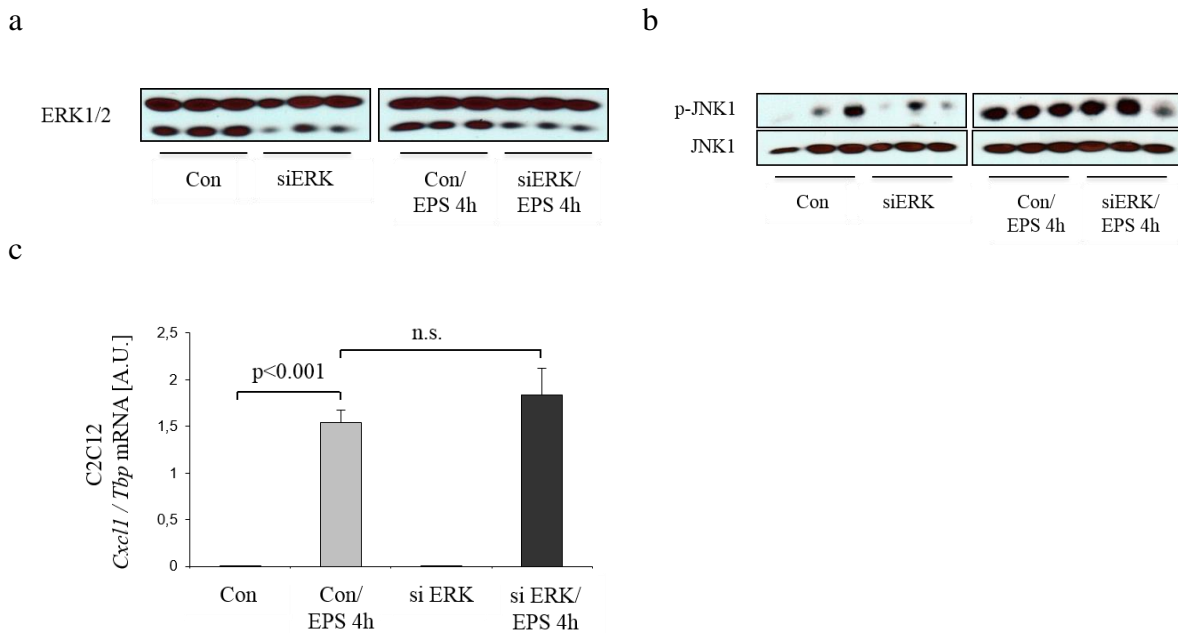


Abbildung 6.15: Eine Herunterregulation von ERK1/2 hat keinen Effekt auf die Expression von *Cxcl1* in C2C12 Zellen. Gezeigt sind Western Blots von [a] ERK1/2 Protein (p44/p42 MAPK) und [b] phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (p-JNK) und dem dazugehörigen SAPK/JNK Protein Reblot (JNK) (von je 3 Proben pro Gruppe; jeweils 40 µg Protein pro SDS Gel wurden aufgetragen) sowie [c] die *Cxcl1* Expression in Luciferase siRNA transfizierten C2C12 Zellen, (Con) oder ERK1/2 (MAPK3 / MAPK1) siRNA transfizierten C2C12 Zellen (siERK) ohne bzw. mit 4-stündiger EP-Stimulation (EPS 4h). Die *Cxcl1* mRNA-Menge wurde über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von n=3 Proben (n.s. = nicht signifikant).

6.4.5 Die Applikation des JNK Inhibitors VIII hemmt die EPS-induzierte Expression von *Cxcl1* in C2C12 Zellen

Da die Hemmung der ERK1/2 MAPK in vitro weder durch die Inhibition mit U0126 noch mit PD184352 eine Beeinflussung der Genexpression von *Ppargc1a* und *Cxcl1* zeigte, stellte sich die Frage, ob die gleichzeitige Inhibition der JNK Kinase durch U0126 in vivo (Abbildung 6.6)

für die Hemmung von *Ppargc1a*, *Cxcl1* und der IEGs nach Ausdauersport im Muskel verantwortlich ist (Abbildung 6.7 und Abbildung 6.10). Für die Aufklärung dieser Fragestellung wurden differenzierte C2C12 Zellen entweder mit 0.1% DMSO (Con) oder mit dem JNK Inhibitor VIII (10 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend für 4 Stunden EP-stimuliert (EPS 4h). Der JNK Inhibitor VIII bindet kovalent an einen konservierten Cysteinrest in einem ATP-Bindemotiv. Infolgedessen hemmt der Inhibitor die biochemische Aktivität von JNK und verhindert somit eine Phosphorylierung von JNK Substraten wie c-Jun (Jun) (172).

Diese Ergebnisse belegen, dass nicht die Hemmung der ERK1/2 Kinase Aktivität, sondern die unerwartete Hemmung der JNK Aktivität durch U0126 *in vivo* für die verminderte Genexpression von *Cxcl1* und eventuell auch von *Ppargc1a* und der IEGs im Skelettmuskel verantwortlich sein könnte.

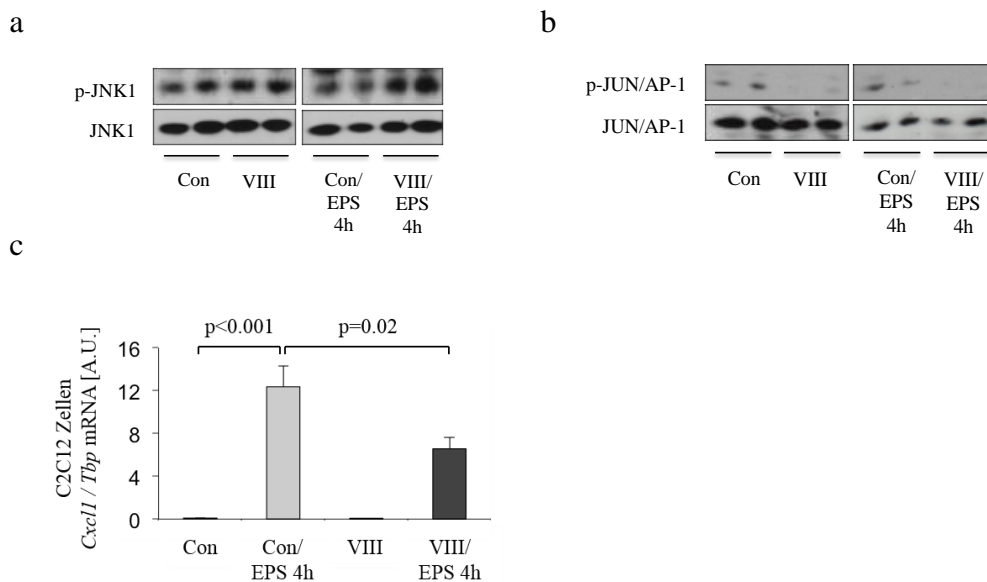


Abbildung 6.16: Eine Hemmung der JNK Aktivität führt zu einer erniedrigten EP-stimulierten *Cxcl1* Expression in C2C12 Zellen. Gezeigt sind die Western Blots von [a] phospho-SAPK/JNK (p-JNK) (Thr183/Tyr185) und dem dazugehörigen SAPK/JNK (JNK) Protein Reblot und [b] phospho-c-Jun (p-Jun) (Ser73) und dem dazugehörigen c-Jun Protein (Jun) Reblot (von je 2 Proben pro Gruppe; jeweils 40 μ g Protein pro SDS Gel wurden aufgetragen) sowie [c] die *Cxcl1* mRNA Expressionslevel in differenzierten C2C12 Kontrollzellen (Con) oder JNK Inhibitor VIII applizierten Zellen ohne oder mit 4-stündiger EP-Stimulation (EPS 4h). Die *Cxcl1* mRNA-Menge wurde über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=5-6 Proben.

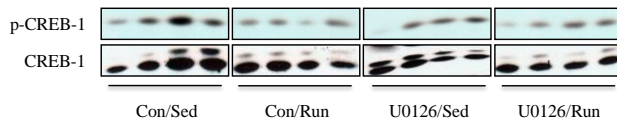
6.4.6 Welcher Signalweg ist in der Leber verantwortlich für die IEG Expression?

Nachdem JNK im Skelettmuskel als wichtige MAPK für die Expression von Cxcl1, Ppargc1a und der IEGs identifiziert wurde, stellte sich die Frage nach dem hierfür verantwortlichen Signalweg in der Leber. Wie anfangs beschrieben kann auch in der Leber eine Hemmung sowohl der ERK1/2 als auch der JNK Aktivität durch den Inhibitor nachgewiesen werden (Abbildung 6.6 [a] und [b]). Jedoch war in der Leber nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf die Expression von Fos, Ppargc1a, Pdk4 und G6pc bei Inhibition mit U0126 nicht erniedrigt (Abbildung 6.7 [b]) und Abbildung 6.8 [a]-[c]) Allein die Jun Expression war nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf in den U0126-applizierten Mäusen tendenziell erniedrigt (Con/Run vs. U0126/Run: $p=0.08$) (Abbildung 6.7 [b]). Da nach diesen Ergebnissen anzunehmen ist, dass weder ERK1/2 noch JNK für die Expression von Ppargc1a, Pdk4, G6pc und der IEGs in der Leber verantwortlich sind, wurde als ein weiterer Kandidat untersucht, ob hierbei eventuell der PKA Signalweg eine bedeutendere Rolle spielt. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde zunächst die Phosphorylierung von CREB mittels einer Western Blot-Analyse untersucht, da eine PKA Aktivierung im weiteren Verlauf auch zu einer Aktivierung bzw. Phosphorylierung von CREB führt (273).

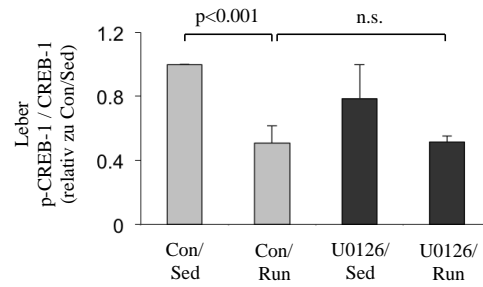
Nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf war die Phosphorylierung von CREB in der Leber signifikant erniedrigt (Con/Sed vs. Con/Run: $p<0.001$). Die Applikation des Inhibitors U0126 hatte darauf keinen Einfluss. Im EDL Muskel war die Phosphorylierung von CREB nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf dagegen unverändert (Con/Sed vs. Con/Run). Auch hier hatte die U0126 Applikation nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf keine Auswirkungen auf die CREB Phosphorylierung (U0126/Run).

Diese Ergebnisse ergeben keinerlei Hinweise auf eine Ausdauersport-induzierte PKA-Aktivierung in der Leber.

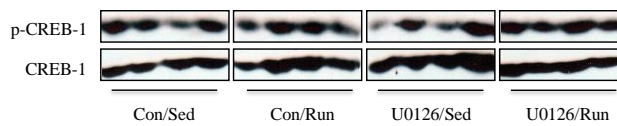
a



d



b



e

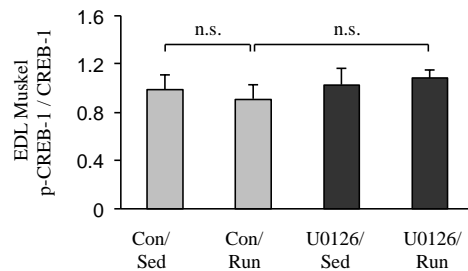


Abbildung 6.17: Die CREB-1 Phosphorylierung wird weder in der Leber noch im Skelettmuskel durch eine U0126 Applikation beeinflusst. Gezeigt sind die Western Blots von [a] phospho-CREB-1 (Ser133) und dem dazugehörigen CREB-1 Protein Reblot in der Leber, [b] phospho-CREB-1 (Ser133) und dem dazugehörigen CREB-1 Protein Reblot im EDL Muskel von Kontrollmäusen (Con) bzw. U0126-applizierten Mäusen (U0126) ohne (Sed) bzw. mit (Run) anschließendem 60-minütigen Ausdauerlauf (von je 4 Mäusen pro Gruppe). Es wurden jeweils 40 μ g Leber Nukleus Extrakt pro SDS Gel aufgetragen. In [d], [e] und [f] sind die jeweiligen densitometrischen Auswertungen der Banden (phospho-CREB-1 bezogen auf CREB-1 Protein gezeigt (Mittelwerte \pm SEM, n=7 Mäuse) (n.s.= nicht signifikant).

6.5 ERK1/2 und JNK sind nicht in allen Muskeltypen nach Ausdauersport phosphoryliert

Wie oben gezeigt werden konnte, ist die Expression von *Fos* und *Jun* im Soleus Muskel nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf signifikant erhöht (Abbildung 6.7 [c] und [d]). Die Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK ist nach dem Ausdauerlauf im EDL Muskel ebenfalls tendenziell erhöht (Abbildung 6.6 [d] und [e]). Aufgrund der Genexpressionsanalyse von *Fos* und *Jun* ist zu vermuten, dass ERK1/2 und JNK auch im Soleus Muskel nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf stärker phosphoryliert sind. Dies konnte nicht abschließend geklärt werden, da die beiden pro Maus zur Verfügung stehenden Soleus Muskeln für die Isolation der RNA und die anschließende qRT-PCR Analyse verwendet wurden.

Es wurde zusätzlich untersucht, ob auch im Tibialis Muskel (Tibialis Anterior), einem Muskel mit überwiegend glykolytischen Muskelfasern wie dem EDL (16), nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK detektiert werden kann. Für die Beantwortung dieser Frage wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK mittels Western Blot-Analyse untersucht. Entgegen den Erwartungen war weder die Phosphorylierung von ERK1/2 noch die von JNK nach dem 60-minütigen Ausdauerlauf im Tibialis Muskel erhöht (Abbildung 6.18 [a]-[d]).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine 60-minütige Ausdauerbelastung nicht in allen Muskeln zu einer MAPK Aktivierung führt. Es kann angenommen werden, dass dies mit einer divergenten Genexpression in den verschiedenen Muskeln korreliert. Somit ist davon auszugehen, dass durch eine ungleiche Beanspruchung während einer 60-minütigen Ausdauerbelastung unterschiedliche Signalwege in den verschiedenen Skelettmuskeln aktiviert werden, was zu unterschiedlichen metabolischen Konsequenzen innerhalb der verschiedenen Muskeln führen kann.

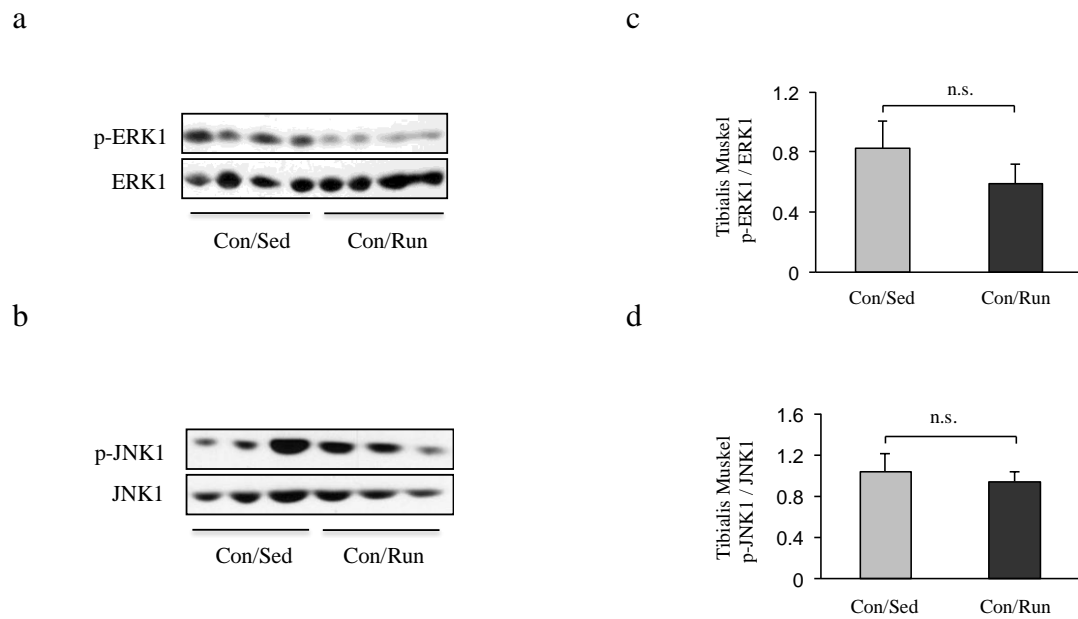


Abbildung 6.18: Ein 60-minütiger Ausdauerlauf bewirkt im Tibialis Muskel keine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK. Gezeigt sind die Western Blots von [a] phospho-p44 MAPK (Thr202/Tyr204) (p-ERK1) und dem dazugehörigen p44 Protein Reblot (von 4 Mäusen pro Gruppe) sowie [b] phospho-SAPK/JNK (p-JNK) und dem dazugehörigen SAPK/JNK Protein Reblot (von 3 Mäusen pro Gruppe) im Tibialis Muskel von Kontrollmäusen (Con) ohne (Sed) oder mit (Run) 60-minütigen Ausdauerlauf. Es wurden jeweils 40 µg Tibialis Muskel Nukleus Extrakt pro SDS Gel aufgetragen. In [c] und [d] sind die jeweiligen densitometrischen Auswertungen der Banden (phospho-ERK1 bezogen auf ERK1 Protein bzw. phospho-SAPK/JNK bezogen auf SAPK/JNK Protein) gezeigt (Mittelwerte \pm SEM, n=7 Mäuse) (n.s. = nicht signifikant).

6.6 Der Einfluss einer 60-minütigen Ausdauerbelastung auf die Expression von FGF21 in Plasma, Leber und Skelettmuskel

Es hat sich gezeigt, dass Mitglieder der FGF Familie auch eine wichtige Rolle bei der Regulation und Funktion einiger endokriner Organe spielen und an der Steuerung metabolischer Prozesse beteiligt sind (95). FGF21 wird hauptsächlich in der Leber und im Fettgewebe (WAT) exprimiert (95, 96). In der Leber wird FGF21 bei Nahrungsrestriktion und T2DM unter der Kontrolle von PPAR α induziert (274-276).

Um die FGF21 Induktion nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf in der Folge auf eine Nahrungsrestriktion und Wiederfütterung, sowie nach Hemmung der ERK1/2 Aktivität durch U0126 in der Leber und im Plasma zu untersuchen, wurde zunächst die FGF21 Konzentration im Plasma mittels eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt und zusätzlich die *Fgf21* Expression in der Leber gemessen.

Ein 60-minütiger Ausdauerlauf bewirkte einen signifikanten FGF21 Anstieg im Plasma und ebenso einen signifikanten Anstieg der *Fgf21* mRNA Expressionslevel in der Leber der Kontrollmäuse. Die Applikation des Inhibitors U0126 hemmte zwar in der Leber die Ausdauer-sport-induzierte *Fgf21* Expression, verhinderte allerdings nicht den FGF21 Anstieg im Plasma (Abbildung 6.19 [a] und [b]). Die 21-stündige Nahrungsrestriktion bewirkte im Vergleich zur Wiederfütterung einen 10-fach höheren Anstieg der FGF21 Konzentration im Plasma (3200 pg/ml (Fast/Sed) vs. 327 pg/ml (Ref/Sed), $p < 0.001$). Der anschließende 60-minütige Ausdauerlauf ergab bei beiden Gruppen (Fast/Run und Ref/Run) keinen zusätzlichen Anstieg des FGF21 Plasmaspiegels (Abbildung 6.19 [c]). Auch die *Fgf21* Expression in der Leber war nach der 21-stündigen Nahrungsrestriktion im Vergleich zur Wiederfütterung 18-fach höher exprimiert (Abbildung 6.19 [d], $p < 0.001$), wobei auch hier in beiden Gruppen (Fast/Run und Ref/Run) der 60-minütige Ausdauerlauf keinen weiteren Anstieg in der *Fgf21* Expression verursachte.

Diese Ergebnisse beweisen, dass FGF21 nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung und auch nach einer Nahrungsrestriktion im Plasma ansteigt und dass dieser Anstieg gleichzeitig mit einer vermehrten *Fgf21* Expression in der Leber korreliert. Eine Hemmung der ERK1/2 MAPK Aktivität durch U0126 verhindert dagegen die Ausdauersport-induzierte hepatische *Fgf21* Expression (Abbildung 6.19 [b]).

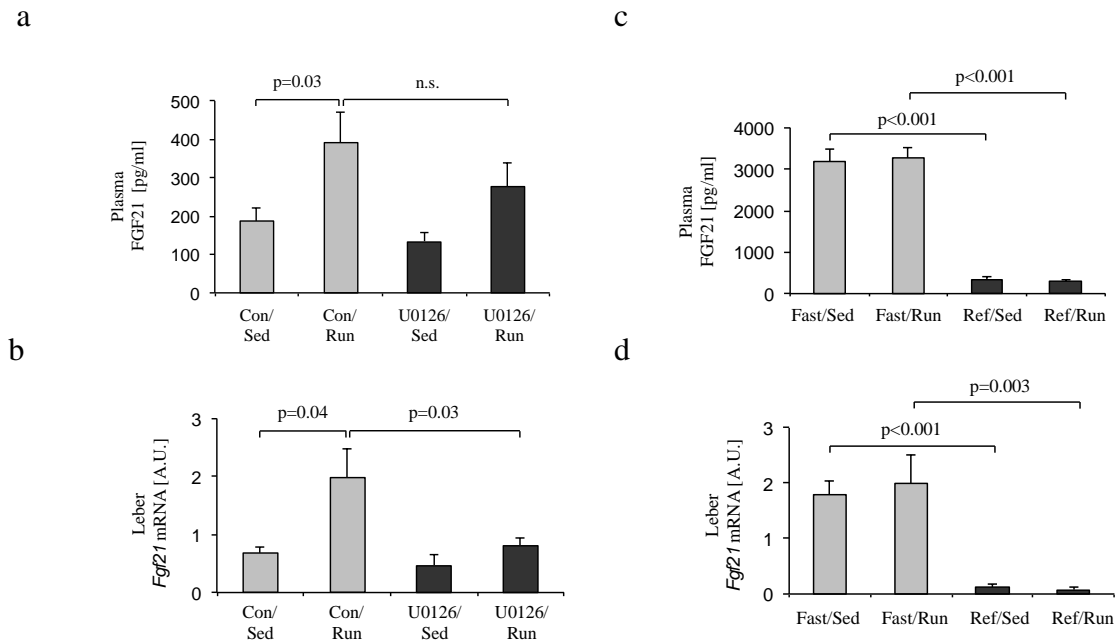


Abbildung 6.19: Eine 60-minütige Ausdauerbelastung allein verursacht einen Anstieg von FGF21 in Plasma und Leber. Gezeigt sind [a] die FGF21 Konzentration im Plasma (pg/ml) und [b] die *Fgf21* mRNA Expressionslevel in der Leber von gefasteten und wiedergefütterten Mäusen ohne (Sed) oder mit 60-minütigem Ausdauerlauf (Run) sowie [c] die FGF21 Konzentration im Plasma (pg/ml) und [d] die *Fgf21* mRNA Expressionslevel in der Leber von Kontrollmäusen (Con) oder U0126-applizierten Mäusen (U0126) ohne (Sed) oder mit 60-minütigen Ausdauerlauf (Run). Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=7-9 Mäusen (n.s. = nicht signifikant).

Nachdem eine 60-minütige Ausdauerbelastung zu einem signifikanten Anstieg der FGF21 Plasmaspiegel und auch der *Fgf21* mRNA Expressionslevel in der Leber führte, stellte sich die Frage, ob ein Ausdauerlauf auch im Muskel und im WAT zu einem Anstieg der *Fgf21* Expression führt. Deshalb wurde mit einer qRT-PCR die Genexpression von *Fgf21* im Soleus, Tibialis und Plantaris Muskel sowie im WAT gemessen.

Der 60-minütige Ausdauerlauf verursachte weder in den genannten Skelettmuskeln noch im WAT einen Anstieg der *Fgf21* Expression. Sowohl in den Muskeln als auch im Fettgewebe waren die Expressionslevel zudem deutlich geringer als in der Leber. Im Plantaris Muskel waren die *Fgf21* Expressionslevel so gering, dass sie nicht detektiert werden konnten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein 60-minütiger Ausdauerlauf nur im Plasma und in der Leber einen Anstieg von FGF21 verursacht.

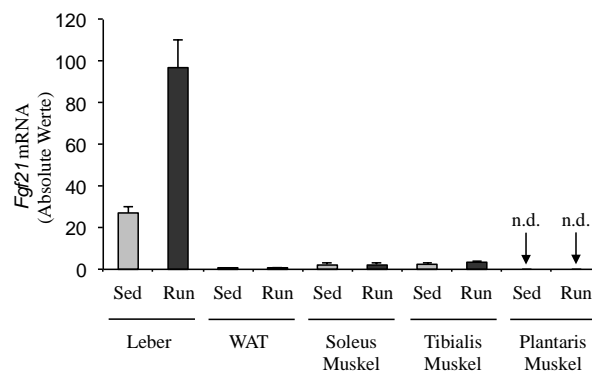


Abbildung 6.20: Nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung ist *Fgf21* im Skelettmuskel nicht exprimiert. Gezeigt sind die *Fgf21* mRNA Expressionslevel ohne (Sed) oder mit 60-minütigen Ausdauerlauf (Run) in Leber- und Fettgewebe, sowie Soleus-, Tibialis- und Plantaris Muskel. Die mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und sind in absoluten Werten angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=3-19 Proben (n.d. = nicht detektierbar).

7 Diskussion

Bewegung und körperliche Aktivität in Form von Ausdauersport ist eine anerkannte Therapiemaßnahme bei metabolischen Funktionsstörungen wie T2DM oder Adipositas. Langfristig führt eine Lebensstilintervention in Verbindung mit körperlicher Aktivität zu einer Verbesserung der Glukosehomöostase sowie zu einer erhöhten kardiorespiratorischen Fitness. Die dafür zugrundeliegenden molekularen Regulationsmechanismen sind bisher nur teilweise bekannt. Das bisher am besten untersuchte Organ während einer Ausdauerbelastung ist der Skelettmuskel. Seit einigen Jahren ist jedoch auch bekannt, dass die Leber während eines Ausdauersports beeinflusst wird. Das Ziel dieser Arbeit war es zum einen, den Einfluss der Energiespeicher in der Leber bei minimaler und maximaler Ladung auf die IEG Expression und den gesamten Metabolismus während einer Ausdauerbelastung zu untersuchen. Zum anderen wurde die Bedeutung des MAPK Signalweges während eines Ausdauersports sowie die möglichen metabolischen Konsequenzen dieser Aktivierung in Leber und Skelettmuskel untersucht.

7.1.1 Folgen einer Nahrungsrestriktion mit zusätzlicher Ausdauerbelastung in Leber und Muskel

Während einer Nahrungsrestriktion sind schnelle metabolische Adaptationen notwendig, um die Energiehomöostase aufrecht zu erhalten. Dies wird durch eine koordinierte Regulation von bestimmten Signalwegen realisiert, die nachfolgend zu einer transkriptionellen Aktivierung oder Unterdrückung bestimmter Gene führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Leber und Skelettmuskel bei Mäusen unterschiedlich auf eine Nahrungsrestriktion reagieren.

Eine 21-stündige Nahrungsrestriktion stellt für die Leber eine hohe metabolische Herausforderung dar. Dies konnte unter anderem anhand des markanten Anstiegs der *G6pc*, *Ppargc1a*, *Igfbp1* und *Pdk4* Expression sowie der Glykogendepletion bestätigt werden. Der Anstieg der freien Fettsäuren im Plasma führt zu einem signifikant erhöhten hepatischen Triglyceridspiegel. Der Anstieg der freien Fettsäuren kann dabei zur Induktion der Glukoneogenese beitragen (277-279).

Alle gemessenen Parameter in dieser Arbeit wiesen bereits nach der 21-stündigen Nahrungsrestriktion einen signifikanten Anstieg und keine weitere Zunahme nach dem 60-minütigen Ausdauersport auf. Auch die hepatische Expression der für die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase relevanten Gene wie *G6pc* und *Ppargc1a* ($PGC1\alpha$) waren nach der Nahrungsrestriktion und einer zusätzlichen Ausdauerbelastung nicht weiter erhöht. Die *Pdk4* Expression

in der Leber der gefasteten Mäuse sank zwar nach dem Ausdauerlauf in gefasteten Mäusen, zeigte aber daher auch wie die anderen untersuchten Gene keinen additiven Effekt. Interessanterweise stieg die hepatische IEG Expression infolge der Nahrungsrestriktion signifikant an, zeigte jedoch ebenfalls keine weitere Zunahme nach dem Ausdauerlauf. Im Skelettmuskel dagegen stiegen die Expressionslevel von c-Fos und c-Jun nicht infolge der Nahrungsrestriktion sondern erst nach dem Ausdauersport an.

Diese gefundenen Unterschiede sind möglicherweise auf die verschiedenen Funktionen von Leber und Skelettmuskel im Metabolismus zurückzuführen. Aufgrund der Rolle der Leber im Glukose- und Lipidstoffwechsel ist sie in erster Linie dafür verantwortlich, den Glukosespiegel aufrecht zu erhalten. Auch im Lipidstoffwechsel nimmt die Leber eine bedeutende Rolle ein. Sie nimmt die bei einer Nahrungsrestriktion oder einem Ausdauersport vermehrten FFA aus dem Blut auf, wo sie entweder oxidiert oder in Form von Triglyzeriden (TG) gespeichert und anschließend wieder in Form von VLDL in die Peripherie abgegeben werden (280, 281). Der Skelettmuskel reesterifiziert ebenso TG, im Gegensatz zur Leber nutzt er sie jedoch selbst als Energiequelle (282).

Auch der Skelettmuskel besitzt wichtige Funktionen in der Regulation der Glukosehomöostase (283). Ein wichtiger Unterschied zur Leber besteht darin, dass die hepatischen Glykogenspeicher der Maus nach einer 16- bzw. 24-stündigen Nahrungsrestriktion schnell verbraucht sind, während die muskulären Glykogenspeicher nur moderat verändert sind (284, 285). Dies konnte auch anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden.

Eine länger dauernde Nahrungsrestriktion und eine Ausdauerbelastung stellen ähnliche Anforderungen an die Regulation der Energiehomöostase im Organismus. Es ist daher zu vermuten, dass die Umstellung des Organismus von Glukose- auf Fettmetabolismus nach der 21-stündigen Nahrungsrestriktion bereits erfolgt ist und dass im Falle einer weiteren Belastung wie einem Ausdauersport keine transkriptionellen Regulationen mehr notwendig sind. Dies würde zumindest teilweise erklären, warum keines der gemessenen Gene in der Leber eine Zunahme der Expression nach dem Ausdauerlauf mit vorausgegangener Nahrungsrestriktion aufwies.

Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass eine Nahrungsrestriktion an sich schon eine hohe energetische Beanspruchung für die Leber darstellt und diese dadurch maximal gefordert wird, so dass eine zusätzliche Belastung in Form eines Ausdauerlaufs keine weiteren additiven Effekte in der hepatischen Regulation des Metabolismus verursacht, während im Skelettmuskel noch Regulationen stattfinden können. Diese an Mäusen gewonnenen Ergebnisse sind möglicherweise nur teilweise auf den Menschen übertragbar, da bei Nagetieren der Leber

eine weitaus größere Bedeutung für die Energieversorgung des Skelettmuskels zukommt als bei Menschen.

7.1.2 Regulation der IEG Expression in Leber und Muskel nach Nahrungsrestriktion und Ausdauersport

Die divergente IEG Expression in Leber und Skelettmuskel nach Nahrungsrestriktion und einer Ausdauerbelastung könnte an der unterschiedlichen Auslenkung der Energiehomöostase in den beiden Organen liegen, aber auch an der Aktivierung und Beteiligung unterschiedlicher Signalwege an der transkriptionellen Regulation dieser Gene in Leber und Muskel.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die IEG Expression in der Leber abhängig vom Glukosestatus des Organismus auftritt. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit vorangegangenen Studien, in denen bereits gezeigt werden konnte, dass die Expression der IEGs *Fos*, *Jun*, *Gadd45g*, *JunB* und *FosB* in der Leber negativ mit dem Plasmaglukosespiegel korreliert (130). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die hepatische IEG Expression Regulationsmechanismen unterliegt, die durch eine Abnahme der Glykogenspiegel und des intrahepatischen ATP-Spiegels bzw. einer Zunahme von AMP aktiviert werden. Dies würde den markanten Anstieg der hepatischen IEGs sowohl nach einer Nahrungsrestriktion als auch nach einem Ausdauersport erklären, da beide Ereignisse eine Abnahme der Plasmaglukosespiegel und damit gegenregulatorische Maßnahmen in der Leber verursachen. Es kann angenommen werden, dass eine Stress- und Belastungssituation, sei es durch eine Nahrungsrestriktion oder durch Ausdauersport, zu einer vermehrten Expression hepatischer IEGs führt, die als Auslöser für die Umstellung der Leber von „Ruhe“ auf „Belastung“ funktionieren. Stellen sich zwei aufeinanderfolgende Belastungssituationen ein und ist die Umstellung bereits erfolgt, scheint kein weiterer Anstieg der IEG Expression mehr möglich zu sein. Inwieweit die Aktivierung der IEGs, insbesondere der Transkriptionsfaktoren des AP-1 Komplexes, an der Regulation des hepatischen Energiestoffwechsels und der Glukosehomöostase beteiligt sind, bleibt unklar. Da der eingesetzte Inhibitor U0126 die Aktivierung dieser Gene in der Leber nicht verhindern konnte, lassen sich aus der vorliegenden Arbeit keine Schlüsse ziehen.

Im Gegensatz dazu ist aufgrund des Anstiegs der *Fos* Expression im Skelettmuskel sowohl in gefasteten als auch in wiedergefütterten Mäusen anzunehmen, dass eine Ausdauerbelastung darauf einen größeren Einfluss hat als eine Nahrungsrestriktion. Es kann daher vermutet werden, dass hier auch die mechanische Stimulation des Muskels während der sportlichen Belastung eine große Rolle spielt.

Im Skelettmuskel ist die Expression vieler Gene im Allgemeinen erst in der Erholungsphase nach einem Ausdauersport erhöht (286, 287). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die *Fos* und die *Jun* Expression im Skelettmuskel direkt nach dem Ausdauerlauf induziert ist. Auch andere Studien zeigten bereits einen Anstieg der c-Fos und c-Jun Expression nach Ausdauersport (193, 211, 235). Dies führt nachfolgend zu einer vermehrten Bildung von Fos/Jun Heterodimeren und somit auch zu einer erhöhten AP-1 Bindungsaktivität (236). Daraus kann eine veränderte Genexpression AP-1 abhängiger Gene wie beispielsweise Cyt-c (288), α -Aktin (289), SOD (290), MLC-2 (291), vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) (292) und die Laktatdehydrogenase (LDH) (293) resultieren. Die Induktion dieser Faktoren konnte ebenfalls nach Sport im Skelettmuskel gezeigt werden (290, 294-297). Offensichtlich spielt c-Fos im Skelettmuskel auch bei der Induktion der Apoptose nach einem Ausdauersport eine wichtige Rolle (238).

7.1.3 Die Glykogenspiegel der Leber variieren in Abhängigkeit der aktiven und der inaktiven Phase der Mäuse

Die zirkadiane Uhr beeinflusst in Säugetieren nahezu alle physiologischen Prozesse, wie beispielsweise die Schlaf-Wach-Zyklen, die kardiovaskuläre Aktivität, das endokrine System, die Körpertemperatur, die renale Funktion, den gastrointestinalen Trakt sowie den hepatischen Metabolismus (298, 299). Die metabolischen Antworten in den peripheren Geweben unterliegen dabei einem zeitabhängigen koordinierten Ablauf, der von Licht-Dunkel-Zyklen beeinflusst wird (300). Dabei bestimmt die Tageszeit, in der die Nahrung aufgenommen wird die gesamte metabolische Homöostase (301). Während der Wachphase sind die Fettsäureoxidation und die Glykolyse im Skelettmuskel erhöht. Im Fettgewebe kommt es zu einer gesteigerten Lipogenese und Adiponektin Produktion sowie zu einer erhöhten hepatischen Glykogen-, Cholesteroll- und Gallensäuresynthese und einer erhöhten Insulinsekretion (300). Während der aktiven (Wach-) Phase ist außerdem die Glukokortikoid Ausschüttung erhöht (300). Dagegen kommt es während der inaktiven Schlafphase zu einer erhöhten Melatonin Sekretion sowie zu einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumshormonen (300). Im Skelettmuskel wird während der Schlafphase der oxidative Metabolismus aktiviert, während es in der Leber zu einer gesteigerten Glukoneogenese, Glykogenolyse und mitochondrialen Biogenese kommt (300). Die alpha-Zellen des Pankreas sezernieren währenddessen vermehrt Glucagon und im Fettgewebe kommt es zu einer gesteigerter Lipolyse und einer vermehrten Leptin Sekretion (300).

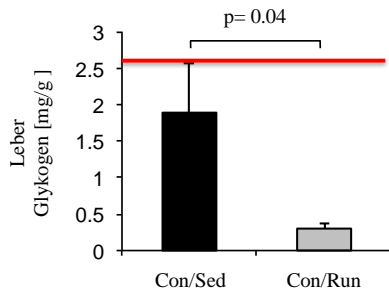
Somit sichert die endogene zirkadiane Uhr die Durchführung physiologischer Prozesse, die optimal auf einen bestimmten Tag- oder Nachtrhythmus ausgelegt sind (298).

Auch bei Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Nahrungsaufnahme oder eine Nahrungsrestriktion abhängig von der zeitlichen Durchführung bestimmte metabolische Prozesse beeinflusst. So konnten Arble *et al.* zeigen, dass eine Nahrungsrestriktion während der inaktiven (Licht-) Phase in einem signifikant höherem Körpergewicht resultiert verglichen mit Mäusen, denen die Nahrung während der aktiven (Dunkel-) Phase entzogen wurde (302).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 15-stündige Nahrungsrestriktion während der inaktiven (Licht-) Phase und eine anschließende 6-stündige Wiederfütterung zu Beginn der aktiven (Dunkel-) Phase einen 200-fachen Anstieg der hepatischen Glykogenspeicher bewirkt. Im Vergleich zu Mäusen, die permanent Zugang zu Futter in der inaktiven (Licht-) Phase hatten (Doktorarbeit Miriam Hoene, Universität Tübingen, 2010) wiesen die wiedergefütterten Mäuse in dieser Arbeit insgesamt einen 15-fach höheren Glykogenspiegel auf (Abbildung 7.1). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass Mäuse während einer Wiederfütterung in der aktiven (Dunkel-) Phase wesentlich mehr Nahrung zu sich nehmen als Mäuse in der inaktiven (Licht-) Phase. Da bekannt ist, dass Mäuse nachtaktive Tiere sind und der Großteil der Nahrungsaufnahme üblicherweise in ihrer aktiven (Dunkel-) Phase stattfindet (303), kann zum einen angenommen werden, dass die Tiere nach der wieder eingesetzten Nahrungsverfügbarkeit (Ref) aufgrund der längeren vorangegangenen Hungerphase mehr Nahrung als üblich aufnahmen, was nachfolgend zu dem außerordentlichen Anstieg der hepatischen Glykogenspeicher geführt haben könnte. Es ist bekannt, dass viele metabolische Gene wie Glukosetransporter und Schlüsselenzyme für den Glukosemetabolismus in der Leber von nachaktiven Tieren zu Beginn der aktiven Phase am höchsten exprimiert sind (304). Dies dient vermutlich zur Erleichterung der Glykogensynthese und der Verwendung von Glukose als primäre Energiequelle in der postadsorptiven Phase (304).

Aufgrund der bereits dargestellten Bedeutung der hepatischen Glykogenspiegel und ATP/AMP Konzentrationen für die Expression nicht nur metabolischer Enzyme sondern auch von IEGs, könnte der Zeitpunkt, zu dem Mäuse einer Ausdauerbelastung unterzogen werden, Einfluss auf die transkriptionelle Antwort in der Leber haben. Es ist davon auszugehen, dass in Experimenten, die zu Beginn der inaktiven (Licht-) Phase stattfinden, höhere Energiereserven in der Leber vorhanden sind als zu Beginn der aktiven (Dunkel-) Phase, was eine unterschiedliche Regulation von Genen zur Folge haben könnte.

a



b

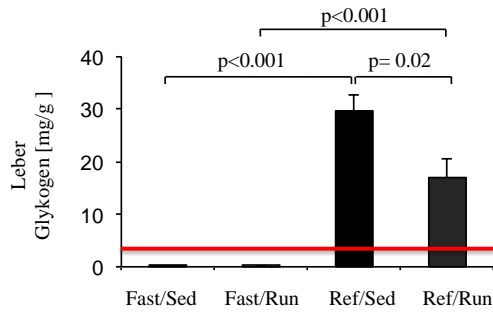


Abbildung 7.1: Vergleich der Glykogenspiegel in der Leber nach Nahrungszufuhr mit oder ohne vorangegangener 16-stündiger Nahrungsrestriktion. Gezeigt sind [a] die Glykogenspiegel vor und nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf ohne vorangegangene Nahrungsrestriktion (Doktorarbeit Miriam Hoene, 2010) und [b] die Glykogenspiegel nach 21-stündiger Nahrungsrestriktion (Fast) bzw. Wiederfütterung (Ref) ohne (Sed) bzw. mit (Run) anschließenden 60-minütigen Ausdauerlauf. Glykogen-Werte sind als mg Glykogen/g eingesetztes Gewebe gezeigt. Der rote Balken symbolisiert den maximalen Glykogenlevel in Kontrollmäusen zu Beginn der aktiven (Dunkel)phase ohne 60-minütigen Ausdauerlauf (Con/Sed) im Vergleich zu wiedergefütterten Mäusen nach vorangegangener Nahrungsrestriktion (Ref/Sed).

7.1.4 Aktivierung von MAPK in der Leber durch Ausdauersport

Durch bisherige Studien ist die Aktivierung der verschiedenen MAPK in der kontrahierenden Skelettmuskulatur bei Menschen und Nagern während Sport nachgewiesen worden, wobei diese abhängig von der Intensität und der Dauer der Belastung war. In der Leber von Mäusen wurde in vorangegangenen Arbeiten eine Phosphorylierung von JNK und einer nicht näher charakterisierten ERK Isoform, die vom eingesetzten phospho-Thr202/Tyr204 ERK1/2 Antikörper erkannt wurde, nachgewiesen (130). In der vorliegenden Arbeit konnte nun eine Phosphorylierung von ERK1/2 an Thr202 und Tyr204 in der Leber von Mäusen nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf gezeigt werden. Die Phosphorylierung von ERK1/2 nach dem Lauf war unabhängig vom Glykogengehalt der Leber sowie der Plasma Glukosekonzentration, so dass es hier eine Divergenz zwischen der IEG Expression und der ERK Aktivierung gibt. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es keine direkte Korrelation zwischen der hepatischen ERK1/2 Aktivierung und der IEG Expression nach Ausdauersport gibt und dass bei letzterer vermutlich ERK-unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen. Zur möglichen Identität der genannten ERK Isoform gab es keine neuen Erkenntnisse in der vorliegenden Arbeit.

Die bereits beschriebene Phosphorylierung der JNK MAPK in der Leber nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung konnte bestätigt werden.

7.2 Ist die Aktivierung von ERK1/2 an der Sport-induzierten Genexpression in Leber und Muskel beteiligt?

Die Ergebnisse dieser und auch vorangegangener Arbeiten zeigen eine Aktivierung der ERK1/2 MAPK sowohl im Skelettmuskel als auch in der Leber nach einer sportlichen Belastung auf (42, 130, 188, 189). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beteiligung der ERK1/2 MAPK an der Ausdauersport-induzierten IEG Expression in Leber und Skelettmuskel unter Verwendung des MEK Inhibitors U0126 untersucht. Die Effektivität des Inhibitors konnte anhand der reduzierten ERK1/2 Phosphorylierung in beiden Geweben evaluiert werden.

7.2.1 Die Wirkung von U0126 auf die Ausdauersport-induzierte Genexpression in Leber und Skelettmuskel

Die anschließende Genexpressionsanalyse wies in der Leber keine signifikante Veränderung der Ausdauersport-induzierten *Fos*, *Jun*, *Ppargc1a* und, *G6pc* und *Pdk4* Expression nach der U0126 Applikation auf. Im Skelettmuskel dagegen war in U0126 applizierten Mäusen die Expression von *Fos* und *Jun* direkt und die von *Ppargc1a* und *Cx11* drei Stunden nach dem Ausdauerlauf im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant erniedrigt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Inhibitor nur im Skelettmuskel eine Wirkung auf die Ausdauersport-induzierte IEG, PGC1 α und CXCL1 Expression hat.

Die Auswertung der Leber Glykogen- und Triglyzeridspiegel offenbarte direkt nach dem Ausdauerlauf wie auch schon die hepatische Genexpressionsanalyse keine Änderungen als Folge der U0126 Applikation. Jedoch konnte abweichend davon eine signifikante Abnahme der hepatischen Triglyzeride nach einer zusätzlichen dreistündigen Erholungsphase beobachtet werden. Dieses Ergebnis wurde bisher nicht weiter untersucht. Da es aber abgesehen davon zu keiner weiteren metabolischen Änderung durch den Inhibitor kam, kann davon ausgegangen werden, dass eine akute Anwendung von U0126 keinen Einfluss auf die hepatische Expression der untersuchten Gene und die Regulation des Glukosemetabolismus während einer Ausdauerbelastung hat.

7.2.2 U0126 wirkt nicht spezifisch

Die Untersuchung der Spezifität des Inhibitors U0126 hinsichtlich der Beeinflussung der JNK und p38 MAPK zeigte, dass dieser nicht nur die Phosphorylierung der ERK1/2, sondern auch die der JNK MAPK hemmt. Dies war sowohl in den untersuchten Leber- wie auch Muskelsätsen der Fall. Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, da die bisher publizierten *in vitro* MAPK Assays keinen Hinweis darauf gaben (305).

Eine nachfolgende Literaturrecherche brachte einen Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung von JNK durch U0126 in einem *in vitro* Experiment. Mauro *et al.* konnten hier zeigen, dass U0126 in humanen Rhabdomyosarkomzellen nicht nur die TPA-stimulierte Aktivierung der ERK1/2 Signalkaskade sondern auch die JNK Aktivierung hemmt (306). Dabei konnten sie jedoch auch eine Zunahme der p38 Phosphorylierung nach der U0126 Applikation beobachten, weshalb sie vermuteten, dass nach der MEK Inhibition entweder p38 die einzige aktive MAPK ist, oder deren Aktivierung invers mit der ERK1/2 und JNK Inaktivierung korreliert (306). Diese Hypothese konnte in der hier vorliegenden Arbeit zumindest *in vivo* nicht bestätigt werden, da die Phosphorylierung der p38 MAPK in der Leber infolge der U0126 Applikation unverändert war.

In dieser Arbeit konnte *in vitro* kein Einfluss des Inhibitors auf die JNK MAPK in Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden. Es kann daher angenommen werden, dass die *in vivo* beobachtete Beeinflussung der JNK MAPK durch indirekte, beispielsweise systemische Faktoren verursacht wird. Vermutlich spielt hier auch die Interaktion der MAPK Signalwege untereinander eine wichtige Rolle.

7.2.3 Mögliche Konsequenzen der unspezifischen Effektivität des Inhibitors

Die ERK1/2 MAPK ist durch ihren Einfluss auf die Regulation von Zellproliferation und Überleben eine bedeutende Komponente onkogener Mechanismen in Krebszellen bzw. Tumoren (307). Aus diesem Grund ist sie seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Forschungen für die Entwicklung pharmakologischer Inhibitoren in der Krebstherapie (308). Auch U0126 ist bereits in tier- und zellexperimentellen Studien aufgrund seiner Wirkung auf das Tumorstwachstum eingesetzt worden (309-311).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass der Inhibitor wegen seiner Unspezifität und der Blockade einer oder mehrerer Signalkaskaden auch eine Aktivierung neuer Signalwege auslöst und dadurch neben den gewünschten auch unerwünschte Wirkungen auftreten. Da die meisten Signalwege untereinander interagieren, ist dies ein generelles Problem

beim Einsatz von Inhibitoren gegen Signaltransduktionskomponenten, da durch das gezielte Ausschalten einer Komponente die gesamte zelluläre Antwort in positiver und/oder negativer Weise beeinflusst werden kann.

Durch den *in vivo* Einfluss des Inhibitors nicht nur auf die ERK1/2- sondern auch die JNK MAPK ergeben sich hinsichtlich des Einsatzes als therapeutische Substanz mehrere Möglichkeiten. Die JNK MAPK spielt eine wichtige Rolle sowohl bei inflammatorischen, neurodegenerativen und metabolischen Krankheiten als auch bei der Tumorentwicklung und dem Tumorzellüberleben (312). Insbesondere hat sich herausgestellt, dass JNK bei der Entwicklung einer Fettsucht, bei T2DM und Insulinresistenz von großer Bedeutung ist (313).

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass *ob/ob* Mäuse und Mäuse, denen eine fettreiche Nahrung (HFD) gefüttert wurde, spontan eine hohe JNK Aktivität in Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe entwickeln, wohingegen Mäuse, denen JNK fehlte, eine verringerte Fettsucht und eine verbesserte Insulinrezeptor (IR) Signalübertragung aufwiesen (314). Diese Ergebnisse offenbaren JNK als wichtiges Ziel für die Behandlung eines T2DM und Adipositas (312). Da auch eine vermehrte Aktivierung von ERK als Pathomechanismus bei der Entstehung von Insulinresistenz diskutiert wird (315), wäre ein experimenteller Einsatz von U0126 in dieser Hinsicht denkbar.

7.2.3.1 Welche Signalwege könnten an der IEG Expression in der Leber nach Ausdauersport beteiligt sein?

Da die Ergebnisse dieser Arbeit in der Leber keinen Einfluss der MAPK Signalwege auf die hepatische Ausdauersport-induzierte IEG Expression bestätigen konnten, stellt sich weiterhin die Frage nach den hierbei involvierten Signalwegen.

Bereits in der Einleitung wurde beschrieben, dass energetischer Stress in Form eines Ausdauerlaufs in der Leber unter anderem zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege führt (117). Dies wird hauptsächlich durch den sinkenden Plasmaglukosespiegel verursacht, der zu einem Abfall der Insulin- und einem gleichzeitigen Anstieg der Glucagonspiegel führt, was in der Leber eine Abnahme der Glykogenspeicher und einen Anstieg des AMP/ATP Quotienten verursacht (117).

Die Bindung von Glucagon an seinen Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und einer darauffolgenden Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die für die Phosphorylierung verschiedener Proteine, wie beispielsweise CREB zuständig ist, welche für die Stimulation der hepatischen Glukose-

produktion verantwortlich sind (316). Neue Studien belegen, dass Glucagon den Insulin Signalweg über eine Aktivierung des PKA-AMPK Signalweges inhibiert (316). Dies verdeutlicht die Relevanz dieses Signalweges in der Leber während einer verminderten Glukosezufuhr. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die PKA somit in der Leber bei verschiedenen Formen von zellulärem Stress eine bedeutende Rolle einnimmt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst vermutet, dass die PKA bei der Aktivierung der hepatischen IEGs während eines Ausdauersports relevant ist. Eine Ausdauersport-induzierte CREB Phosphorylierung und somit ein Hinweis auf eine Aktivierung des PKA Signalweges in der Leber konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Trotzdem kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass cAMP und eine nachfolgende PKA Aktivierung dennoch eine relevante Rolle bei der hepatischen IEG Expression spielen, da bereits gezeigt werden konnte, dass die cAMP Konzentrationen in der Leber bei Ausdauersport in Abhängigkeit der Belastungsintensität ansteigen (317). Interessant hierbei wäre ebenso die mögliche Interaktion der PKA mit den MAPK Signalwegen, da verschiedene Studien bereits in Fibroblasten (318, 319), Fettzellen (320) und glatten Muskelzellen (321) zeigen konnten, dass die PKA in der Lage ist, die RAF-MEK1/2-ERK1/2 Signalkaskade zu inhibieren.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, betrifft die Rolle von Calcium und Catecholaminen bei Ausdauersport. Die Aktivierung von alpha-adrenergen Rezeptoren durch Catecholamine führt zu einer Calcium-Ausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (322). Durch die darauffolgende Bindung von Calcium an die Phosphorylase-Kinase wird unter anderem die Glykogenolyse aktiviert (322), wobei denkbar ist, dass auch hierbei die IEG Expression involviert sein könnte.

Für weitergehende Betrachtungen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren ist zu berücksichtigen, dass die Leber auf akuten Ausdauersport nicht nur mit einer Induktion von IEGs sondern einer ganzen Reihe metabolischer Enzyme und Regulatoren reagiert (116), was mit einer Aktivierung weiterer Signalwege verbunden ist. Neben den MAPK Signalwegen konnten vorangegangene Studien in der Leber von Nagetieren nach Ausdauersport unter anderem auch die Aktivierung der AMPK (116, 125, 323, 324), des PPAR α Signalweges (120) sowie des IL-6 abhängigen JAK/STAT Signalweges (121) evaluieren.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass in der Leber bei akutem Ausdauersport verschiedene Signalwege aktiviert werden und daher die IEG Induktion von einer ganzen Reihe Faktoren abhängig sein kann. Darüber hinaus muss zusätzlich auch eine Interaktion dieser Signalwege in Betracht gezogen werden.

7.2.4 Die JNK MAPK ist im Skelettmuskel entscheidend für die Ausdauersport-induzierte IEG- und Zytokin Expression

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die MAPK ERK und JNK an der Ausdauersport-induzierten IEG- und Zytokin Expression im Skelettmuskel beteiligt sein könnten. Die Ergebnisse der Zellkulturversuche sprechen für einen deutlichen Einfluss der JNK-abhängigen Signalkaskade. Daher könnte die JNK Signalkaskade auch *in vivo* an der Ausdauersport-induzierten IEG und Zytokin Expression beteiligt sein. In einer zukünftigen Arbeit müsste mit einer spezifischen Hemmung von JNK in *in vivo* Studien versucht werden, um zu differenzieren, welche der beiden MAPK an der transkriptionellen Antwort an eine Ausdauerbelastung beteiligt sind und welche Konsequenzen sich daraus für die metabolische Anpassung ergeben. In einer Arbeit mit JNK Inhibitoren und muskelspezifischen JNK-defizienten Mäusen konnte bereits die Bedeutung von JNK an der Sport-induzierten IL-6 Expression gezeigt werden (325). Für die Aktivierung von JNK im arbeitenden Muskel könnte die Bildung von ROS eine Rolle spielen, da bekannt ist, dass Ausdauersport oxidativen Stress verursacht (326). Die JNK Aktivierung hat sich auch bei der ROS-induzierten Insulinresistenz als entscheidender Schlüsselweg herausgestellt (327). Eine Ausdauersport-induzierte JNK-Aktivierung führt hingegen nicht zu einer verschlechterten Insulinwirkung (328), das heißt, dass sich der bei einer sportlichen Belastung induzierte akute oxidative Stress von chronischem Stress, wie er beispielsweise bei einem metabolischen Syndrom auftritt, unterscheidet. Eine Erklärung hierfür könnte eine fehlende Deaktivierung von JNK durch die DUSP sein. Die JNK Proteine werden durch die DUSP16 (MKP7) dephosphoryliert was vermutlich an der Translokation von JNK in den Nukleus beteiligt ist (328). Berdichevsky *et al.* konnten zeigen, dass die MKP7 unter chronischem oxidativen Stress dauerhaft im Nukleus verbleibt, was eine permanente Aktivierung von JNK im Zytosol verursacht. Dort kann JNK zu einer Hemmung von IRS-1 und nachträglich zu einer gestörten Insulin Signalübertragung führen. Dagegen bewirkt der bei einer sportlichen Ausdauerbelastung induzierte akute oxidative Stress eine Verlagerung der MKP7 aus dem Nukleus in das Zytosol was schlussendlich in einer Hemmung der JNK Phosphorylierung und nachfolgend einer verstärkten IRS-1 Aktivität resultiert (328).

7.2.5 Mögliche Ursachen für eine Beeinflussung der JNK MAPK durch U0126

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass die ERK1/2, die JNK und die p38 MAPK untereinander interagieren und teils andere Signalwege indirekt aktivieren oder inhibieren (329).

Für die in dieser Arbeit gezeigte Beeinflussung der JNK Aktivität durch U0126 können anhand der bekannten JNK Regulationen verschiedene Hypothesen aufgestellt werden.

Zum einen kann vermutet werden, dass der Inhibitor *in vivo* nicht nur die MEK1/2, sondern auch die MKK4 und/oder MKK7 inhibiert. Für eine vollständige JNK Aktivierung ist die Aktivierung beider MAPKK erforderlich (175, 330-332), daher ist es vorstellbar, dass die Hemmung einer der beiden Kinasen durch U0126 ausreichend für eine nachfolgende Hemmung von JNK ist.

Eine weitere Hypothese wäre, dass U0126 indirekt zu einer Erhöhung der dephosphorylierenden Kinasen führt (DUSP). Dieser Mechanismus müsste allerdings ERK-unabhängig stattfinden, da ERK1/2 bereits durch U0126 gehemmt ist.

Bereits bekannt ist, dass ERK1/2 den Guanin Nucleotid Austauschfaktor Sos phosphoryliert und somit durch negative Rückkopplung inhibiert, was nachfolgend zu einer Hemmung von Ras führt (333). Dies könnte eine Hemmung der ERK1/2 MAPK, aber auch der Akt/PKB Kinase zur Folge haben. Eine Inhibition der ERK1/2 Aktivität durch U0126 würde dies somit verhindern und könnte indirekt eine verstärkte Aktivierung der Akt/PKB sowie die anschließende Hemmung von JNK verursachen, da es Hinweise auf eine Akt/PKB-vermittelte Hemmung von JNK gibt (334-336) (Abbildung 7.2).

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit in C2C12 Zellen eine Aktivierung der AMPK durch U0126. Dieses wurde auch schon in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) (272) wie auch in Ratten Myotuben (L6 Zellen) beobachtet (315). Hwang *et al.* konnten in Ratten Myotuben dabei darlegen, dass auch eine siRNA-vermittelte Hemmung von ERK zu einer gesteigerten AMPK Phosphorylierung führt. Dies würde bedeuten, dass eine gesteigerte ERK1/2 Aktivität in eine indirekte Hemmung der AMPK involviert ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch nach Inhibition der ERK1/2 Aktivität mit PD184352 keine Aktivierung der AMPK, was vermuten lässt, dass diese nicht durch eine direkte Interaktion von ERK und AMPK Signalwegen zustande kommt.

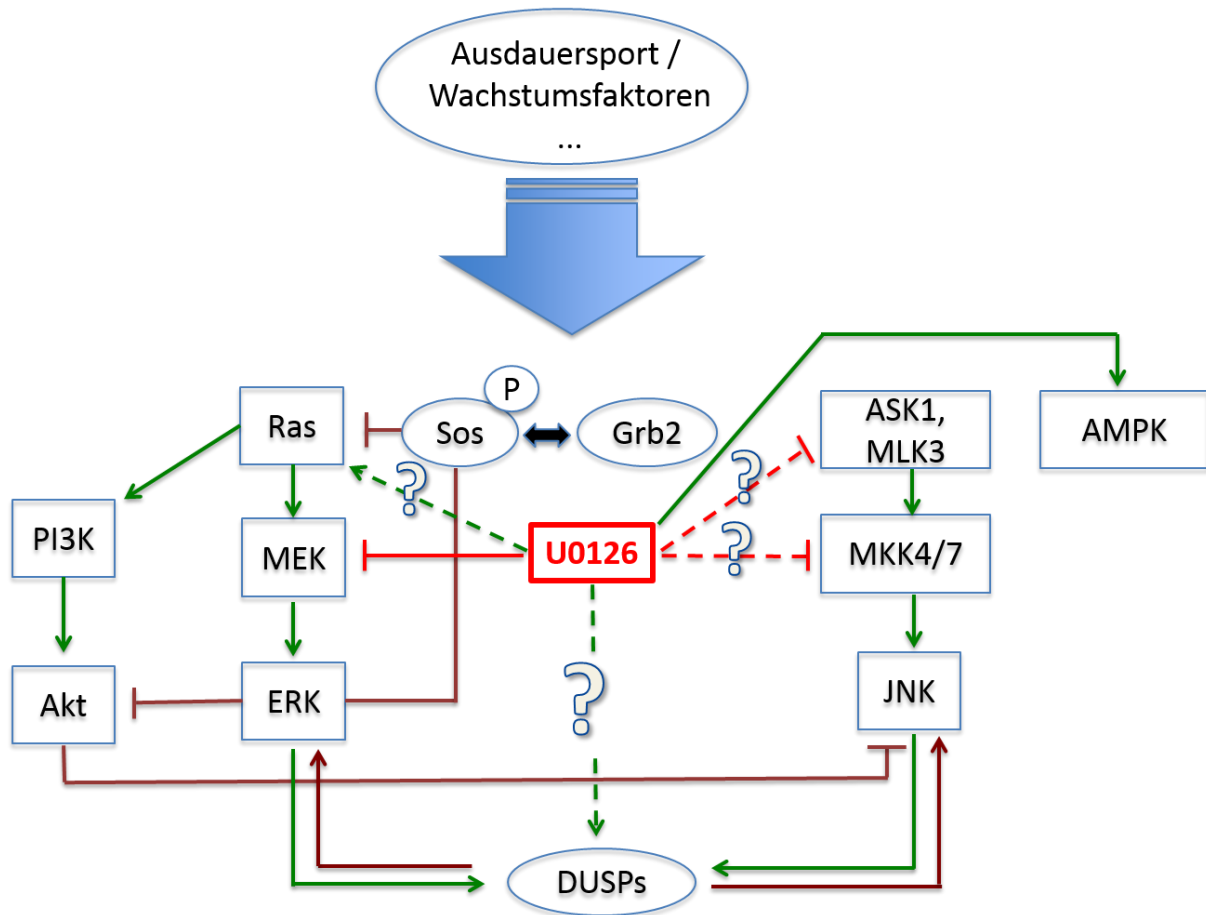


Abbildung 7.2: Hypothetische Beeinflussung der JNK MAPK durch den MEK Inhibitor U0126. Ausdauersport aktiviert verschiedene Signalwege im Skelettmuskel. Neben den MAPK Signalwegen werden unter anderem die Akt Kinase und die AMPK aktiviert. Der Inhibitor U0126 inhibiert direkt die MEK MAPKK und somit die ERK1/2 Signalkaskade. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die JNK MAPK durch den Inhibitor indirekt beeinflusst wird. Die Abbildung verdeutlicht sowohl schon in anderen Arbeiten aufgezeigte Interaktionen (volle Linien) als auch hypothetische Interaktionen (gestrichelte Linien). Die roten Linien verdeutlichen eine (hypothetische) Hemmung und die grünen Striche eine (hypothetische) Aktivierung.

7.3 Der ERK1/2 und JNK MAPK Signalweg ist nach einem Ausdauersport nicht in allen Skelettmuskeltypen aktiviert

Wie schon in der Einleitung beschrieben besteht der Skelettmuskel aus verschiedenen schnellen und langsam zuckenden Muskelfasern, die unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen (16). Die Skelettmuskeltypen der Maus unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Muskelfasern und haben je nachdem einen mehr oxidativen oder glykolytischen Stoffwechsel. Je nach Art der Belastung werden unterschiedliche Muskeltypen beansprucht (337-339).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten nach einem Ausdauersport interessanterweise auch eine divergente Phosphorylierung in den verschiedenen Skelettmuskeltypen. So sind ERK1/2 und JNK zwar im EDL, nicht aber im Tibialis Muskel nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf signifikant stärker phosphoryliert. Ebenso konnte in einer vorangegangenen Arbeit dargestellt werden, dass die IEGs c-Fos und c-Jun im Tibialis Muskel nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf im Vergleich zum Soleus Muskel nicht verstärkt exprimiert bzw. sogar reprimiert sind (Doktorarbeit Miriam Hoene, Universität Tübingen, 2010). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Unterschiede zwischen verschiedenen Muskeltypen und zeigen, dass Protein- und Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit vom jeweiligen Muskel zu unterschiedlichen Resultaten führen können.

Ein Ausdauersport verursacht zwar vor allem im oxidativen Soleus Muskel, der zum größten Teil aus Typ 1 Muskelfasern besteht (340), einen signifikanten Anstieg der IEGs, nicht aber im vorwiegend aus Typ 2B Muskelfasern bestehenden glykolytischen Tibialis Muskel (340). Auch im EDL Muskel, der ebenfalls überwiegend aus Typ 2 Muskelfasern besteht (341), im Vergleich zum Tibialis Muskel jedoch einen höheren Anteil an Typ 1 Muskelfasern besitzt, ist die Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK nach dem Ausdauersport signifikant verstärkt.

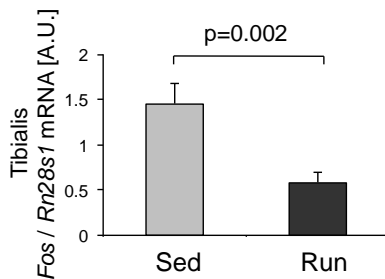
Eine muskelfaserspezifische Zytokin Expression wurde von Plomgaard *et al.* bereits in unterschiedlichen humanen Skelettmuskeln beobachtet. Dabei konnten sie zeigen, dass TNF α , und IL-18 ausschließlich in Typ 2 Muskelfasern exprimiert werden, wohingegen IL-6 primär in Typ 1 Muskelfasern exprimiert wird (342).

Auch eine AMPK Phosphorylierung und Expression tritt im humanen Skelettmuskel sowohl basal als auch bei Ausdauersport faserspezifisch auf (343). Lee-Young *et al.* konnten hierbei beobachten, dass die basale AMPK Phosphorylierung im humanen Skelettmuskel vorwiegend in Typ 2A Muskelfasern erfolgt (343). Eine einzelne sportliche Belastung erhöht dabei die AMPK Phosphorylierung in allen Muskelfasern, primär verstärkt jedoch in Typ 2X Muskelfasern (343). Auch für GLUT4 konnte bereits im humanen Skelettmuskel eine faserspezifische

Expression aufgezeigt werden (344). Neben dem Unterschied im Metabolismus je nach Fasertypenzusammensetzung ist sehr gut vorstellbar, dass auch die Lage des Skelettmuskels und seine spezifische Belastung während eines Ausdauersports eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Signaltransduktionswegen spielen. Irintchev *et al.* fanden in Mausstudien, dass im Soleus und im Tibialis Muskel, nicht aber im EDL Muskel zu Beginn eines freiwilligen Lauftradtrainings Muskelfaserschädigungen auftreten (345). Wernig *et al.* vermuteten daher, dass die vermehrte Typ-1 Muskelfaserbildung im Soleus Muskel infolge eines Intervall Ausdauertrainings offenbar von Art und Ausmaß der Muskelschädigung abhängt, da im EDL Muskel keine Muskelfaserumschaltung beobachtet werden konnte (346). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die unterschiedlichen Arten der Belastung der Skelettmuskeln während eines Ausdauersports auch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege bedingen können.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine divergente muskelspezifische Aktivierung von Signalwegen bzw. Genexpressionen in verschiedenen Skelettmuskeln. Für nachfolgende Arbeiten sollten daher die Ergebnisse kritisch im Hinblick auf den jeweiligen Muskeltyp betrachtet werden.

a



b

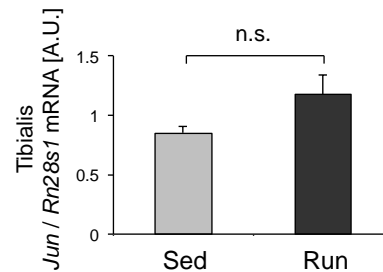


Abbildung 7.3 Fos und Jun Expression im Tibialis Muskel nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf (Miriam Hoene Doktorarbeit, 2010): Die [a] Fos und [b] Jun Expression ist im Tibialis Muskel nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf nicht erhöht. Gezeigt sind die mRNA Expressionen von Fos und Jun im Tibialis Muskel von Mäusen nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf auf einem Laufband. Die Fos und Jun mRNA-Mengen wurden über den Bezug auf den jeweiligen internen Standard bestimmt und anschließend in willkürliche Einheiten umgerechnet (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=20 Mäusen (Miriam Hoene Doktorarbeit Universität Tübingen, 2010).

7.4 Die Bedeutung von FGF21 in Leber und Skelettmuskel bei Ausdauersport

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass FGF21 eine große Bedeutung bei der durch Nahrungsrestriktion oder Ausdauersport-induzierten Lipolyse, Fettsäureoxidation und Ketogenese hat (274, 275). In der Leber aktiviert FGF21 unter anderem PGC1 α , G6Pase und PEPCK (114) und reguliert somit den Kohlenhydrat- und Fettmetabolismus während einer Nahrungsrestriktion (100).

Die FGF21 Plasmaspiegel und auch die hepatische FGF21 Expression sind nach einer sportlichen Belastung erhöht, wobei dies positiv mit den FFA, Glycerol und Keton Plasmaspiegeln korrelierte (347). Die hepatische FGF21 Expression wird dabei synergistisch und vermutlich stressabhängig durch PPAR α und ATF4 induziert (347). Die Bedeutung von FGF21 bei Ausdauersport ist nicht im Detail geklärt, aber aufgrund seiner Bedeutung im Glukose- und Fettmetabolismus wird vermutet, dass FGF21 einige der Ausdauersport-induzierten gesundheitsfördernden Effekte vermittelt (347).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 21-stündige Nahrungsrestriktion FGF21 in Leber und Plasma induziert und dass auch hierbei ein zusätzlicher Ausdauerlauf keinen additiven Effekt hat. Daher ist zu vermuten, dass auch FGF21 in der Leber abhängig vom hepatischen Energiestatus exprimiert wird. Eine Glucagon-abhängige Expression wurde bereits nachgewiesen (348).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen in Übereinstimmung mit früheren Studien (347) einen Ausdauersport-induzierten Anstieg der FGF21 Expression in der Leber, nicht jedoch in WAT und Skelettmuskel. Andererseits konnten Izumiya *et al.* zeigen, dass die FGF21 Expression im Gastrocnemius Muskel von Akt1-transgenen Mäusen signifikant erhöht ist und dass eine Überexpression von Akt1 sowie eine Insulin Stimulation in Mausmuskelzellen (C2C12) zu einer erhöhten FGF21 Expression führen (97). Da die Insulinspiegel bei einer Ausdauerbelastung generell niedrig sind, wäre erklärbar, dass die FGF21 mRNA Expression im Skelettmuskel ebenfalls niedrig ist. Vorangegangene Studien konnten weiterhin darstellen, dass der erhöhte FGF21 Plasmaspiegel in T2DM Patienten nicht mit der FGF21 mRNA Expression im Skelettmuskel korreliert (349). Dies spricht dafür, dass die FGF21 Expression im Skelettmuskel nicht zu den FGF21 Spiegeln im Plasma beiträgt.

Interessanterweise war die hepatische FGF21 Expression durch eine U0126 Applikation signifikant erniedrigt. Hier sind weitere Untersuchungen hinsichtlich des zugrunde liegenden Mechanismus notwendig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass FGF21 während einer sportlichen Belastung nur in der Leber, nicht aber im Skelettmuskel und im WAT relevant exprimiert wird.

7.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit stellt dar, dass ein 60-minütiger Ausdauerlauf in der Leber die ERK1/2 und die JNK MAPK aktiviert. Die Ausdauersport-induzierte hepatische IEG Expression tritt dabei in Abhängigkeit des Energiestatus und der Glukoseverfügbarkeit auf.

Die Ausdauersport-induzierten IEGs und Zytokine im Skelettmuskel werden vermutlich JNK-abhängig exprimiert, wobei die IEG Expression dabei nicht in allen Skelettmuskeltypen nach dem Ausdauersport-induziert wird.

Darüber hinaus zeigt diese Arbeit einen Ausdauersport-induzierten Anstieg des FGF21 Plasmaspiegels sowie der hepatischen FGF21 Expression, nicht aber der FGF21 Expression in Fettgewebe und Skelettmuskel.

Da in dieser Arbeit sowohl die ERK als auch die JNK MAPK nicht als verantwortliche Signalwege für die während eines Ausdauersports vermehrte IEG und Zytokin Expression in der Leber nachgewiesen werden konnten, stellt sich weiterhin die Frage nach dem hierfür verantwortlichen Signalweg in der Leber. Die Vermutung, dass hierbei der Proteinkinase-A (PKA) Signalweg eine bedeutendere Rolle spielt, konnte nicht bestätigt werden. Somit sollte sich der Fokus in nachfolgenden Arbeiten gezielt auf Signalwege in der Leber richten, die für die Ausdauersport-induzierte hepatische IEG und Zytokin Expression verantwortlich sein könnten.

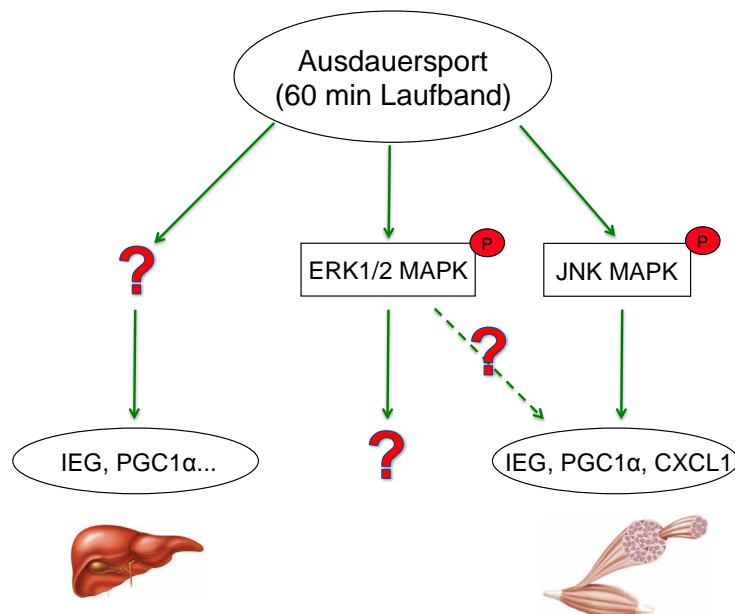


Abbildung 7.4: Die JNK MAPK ist für die Ausdauersport-induzierte IEG, PGC1 α und CXCL1 Expression im Skelettmuskel verantwortlich. Die ERK1/2 und JNK MAPK werden in Leber und Skelettmuskel durch Ausdauersport-induziert. Im Skelettmuskel ist die Phosphorylierung der JNK MAPK ausschlaggebend für die vermehrte IEG, PGC1 α und CXCL1 Expression. Ungeklärt ist noch der für die Ausdauersport-induzierte IEG und PGC1 α Expression verantwortliche Signalweg in der Leber.

8 Literatur

1. Gill, J. M., Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness and Insulin Resistance: A Short Update. *Current opinion in lipidology* **18**, 47-52 (2007); published online EpubFeb (10.1097/MOL.0b013e328012b8bd).
2. O'Gorman, D. J., Krook, A., Exercise and the Treatment of Diabetes and Obesity. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **37**, 887-903 (2008); published online EpubDec (10.1016/j.ecl.2008.07.006).
3. Rockl, K. S., Witzak, C. A., Goodyear, L. J., Signaling Mechanisms in Skeletal Muscle: Acute Responses and Chronic Adaptations to Exercise. *IUBMB life* **60**, 145-153 (2008); published online EpubMar (10.1002/iub.21).
4. Hordern, M. D., Dunstan, D. W., Prins, J. B., Baker, M. K., Singh, M. A., Coombes, J. S., Exercise Prescription for Patients with Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes: A Position Statement from Exercise and Sport Science Australia. *Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia* **15**, 25-31 (2012); published online EpubJan (10.1016/j.jsams.2011.04.005).
5. Colberg, S. R., Physical Activity, Insulin Action, and Diabetes Prevention and Control. *Current diabetes reviews* **3**, 176-184 (2007); published online EpubAug (
6. Wannamethee, S. G., Shaper, A. G., Weight Change and Duration of Overweight and Obesity in the Incidence of Type 2 Diabetes. *Diabetes care* **22**, 1266-1272 (1999); published online EpubAug (
7. Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Lachin, J. M., Walker, E. A., Nathan, D. M., Diabetes Prevention Program Research, G., Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *The New England journal of medicine* **346**, 393-403 (2002); published online EpubFeb 7 (10.1056/NEJMoa012512).
8. Li, G., Zhang, P., Wang, J., Gregg, E. W., Yang, W., Gong, Q., Li, H., Li, H., Jiang, Y., An, Y., Shuai, Y., Zhang, B., Zhang, J., Thompson, T. J., Gerzoff, R. B., Roglic, G., Hu, Y., Bennett, P. H., The Long-Term Effect of Lifestyle Interventions to Prevent Diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: A 20-Year Follow-up Study. *Lancet* **371**, 1783-1789 (2008); published online EpubMay 24 (10.1016/S0140-6736(08)60766-7).
9. Lindstrom, J., Ilanne-Parikka, P., Peltonen, M., Aunola, S., Eriksson, J. G., Hemio, K., Hamalainen, H., Harkonen, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Mannelin, M., Paturi, M., Sundvall, J., Valle, T. T., Uusitupa, M., Tuomilehto, J.,

- Finnish Diabetes Prevention Study, G., Sustained Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes by Lifestyle Intervention: Follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* **368**, 1673-1679 (2006); published online EpubNov 11 (10.1016/S0140-6736(06)69701-8).
10. Pan, X. R., Li, G. W., Hu, Y. H., Wang, J. X., Yang, W. Y., An, Z. X., Hu, Z. X., Lin, J., Xiao, J. Z., Cao, H. B., Liu, P. A., Jiang, X. G., Jiang, Y. Y., Wang, J. P., Zheng, H., Zhang, H., Bennett, P. H., Howard, B. V., Effects of Diet and Exercise in Preventing Niddm in People with Impaired Glucose Tolerance. The Da Qing Igt and Diabetes Study. *Diabetes care* **20**, 537-544 (1997); published online EpubApr (
11. Schafer, S., Kantartzis, K., Machann, J., Venter, C., Niess, A., Schick, F., Machicao, F., Haring, H. U., Fritsche, A., Stefan, N., Lifestyle Intervention in Individuals with Normal Versus Impaired Glucose Tolerance. *European journal of clinical investigation* **37**, 535-543 (2007); published online EpubJul (10.1111/j.1365-2362.2007.01820.x).
12. Stefan, N., Fritsche, A., Haring, H. U., [Individualized Prevention of Type 2 Diabetes]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **52**, 677-682 (2009); published online EpubJul (10.1007/s00103-009-0868-7).
13. Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J. G., Valle, T. T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Salminen, V., Uusitupa, M., Finnish Diabetes Prevention Study, G., Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *The New England journal of medicine* **344**, 1343-1350 (2001); published online EpubMay 3 (10.1056/NEJM200105033441801).
14. Diabetes Prevention Program Research, G., The Diabetes Prevention Program (Dpp): Description of Lifestyle Intervention. *Diabetes care* **25**, 2165-2171 (2002); published online EpubDec (
15. Boule, N. G., Kenny, G. P., Haddad, E., Wells, G. A., Sigal, R. J., Meta-Analysis of the Effect of Structured Exercise Training on Cardiorespiratory Fitness in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetologia* **46**, 1071-1081 (2003); published online EpubAug (10.1007/s00125-003-1160-2).
16. Schiaffino, S., Reggiani, C., Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological reviews* **91**, 1447-1531 (2011); published online EpubOct (10.1152/physrev.00031.2010).

17. Egan, B., Zierath, J. R., Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell metabolism* **17**, 162-184 (2013); published online EpubFeb 5 (10.1016/j.cmet.2012.12.012).
18. Knechtle, B., [Energy Turnover in Endurance Exercise]. *Praxis* **93**, 457-468 (2004); published online EpubMar 17 (
19. Spriet, L. L., Regulation of Skeletal Muscle Fat Oxidation During Exercise in Humans. *Medicine and science in sports and exercise* **34**, 1477-1484 (2002); published online EpubSep (10.1249/01.MSS.0000027688.49712.5B).
20. Romijn, J. A., Coyle, E. F., Sidossis, L. S., Gastaldelli, A., Horowitz, J. F., Endert, E., Wolfe, R. R., Regulation of Endogenous Fat and Carbohydrate Metabolism in Relation to Exercise Intensity and Duration. *The American journal of physiology* **265**, E380-391 (1993); published online EpubSep (
21. Tremblay, A., Simoneau, J. A., Bouchard, C., Impact of Exercise Intensity on Body Fatness and Skeletal Muscle Metabolism. *Metabolism: clinical and experimental* **43**, 814-818 (1994); published online EpubJul (
22. Holloszy, J. O., Biochemical Adaptations in Muscle. Effects of Exercise on Mitochondrial Oxygen Uptake and Respiratory Enzyme Activity in Skeletal Muscle. *The Journal of biological chemistry* **242**, 2278-2282 (1967); published online EpubMay 10 (
23. Richter, E. A., Hargreaves, M., Exercise, Glut4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Physiological reviews* **93**, 993-1017 (2013); published online EpubJul (10.1152/physrev.00038.2012).
24. Jensen, J., Rustad, P. I., Kolnes, A. J., Lai, Y. C., The Role of Skeletal Muscle Glycogen Breakdown for Regulation of Insulin Sensitivity by Exercise. *Frontiers in physiology* **2**, 112 (2011)10.3389/fphys.2011.00112).
25. Bergstrom, J., Hultman, E., Muscle Glycogen Synthesis after Exercise: An Enhancing Factor Localized to the Muscle Cells in Man. *Nature* **210**, 309-310 (1966); published online EpubApr 16 (
26. Deshmukh, A. S., Hawley, J. A., Zierath, J. R., Exercise-Induced Phospho-Proteins in Skeletal Muscle. *International journal of obesity* **32 Suppl 4**, S18-23 (2008); published online EpubSep (10.1038/ijo.2008.118).
27. van Loon, L. J., Greenhaff, P. L., Constantin-Teodosiu, D., Saris, W. H., Wagenmakers, A. J., The Effects of Increasing Exercise Intensity on Muscle Fuel Utilisation in Humans. *The Journal of physiology* **536**, 295-304 (2001); published online EpubOct 1 (

28. Watt, M. J., Spriet, L. L., Triacylglycerol Lipases and Metabolic Control: Implications for Health and Disease. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **299**, E162-168 (2010); published online EpubAug (10.1152/ajpendo.00698.2009).
29. Sakamoto, K., Goodyear, L. J., Invited Review: Intracellular Signaling in Contracting Skeletal Muscle. *Journal of applied physiology* **93**, 369-383 (2002); published online EpubJul (10.1152/jappphysiol.00167.2002).
30. Chin, E. R., Intracellular Ca²⁺ Signaling in Skeletal Muscle: Decoding a Complex Message. *Exercise and sport sciences reviews* **38**, 76-85 (2010); published online EpubApr (10.1097/JES.0b013e3181d495d2).
31. Wright, D. C., Hucker, K. A., Holloszy, J. O., Han, D. H., Ca²⁺ and Ampk Both Mediate Stimulation of Glucose Transport by Muscle Contractions. *Diabetes* **53**, 330-335 (2004); published online EpubFeb (
32. Raney, M. A., Turcotte, L. P., Evidence for the Involvement of Camkii and Ampk in Ca²⁺-Dependent Signaling Pathways Regulating Fa Uptake and Oxidation in Contracting Rodent Muscle. *Journal of applied physiology* **104**, 1366-1373 (2008); published online EpubMay (10.1152/jappphysiol.01282.2007).
33. Aschenbach, W. G., Sakamoto, K., Goodyear, L. J., 5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase, Metabolism and Exercise. *Sports medicine* **34**, 91-103 (2004).
34. Jorgensen, S. B., Jensen, T. E., Richter, E. A., Role of Ampk in Skeletal Muscle Gene Adaptation in Relation to Exercise. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* **32**, 904-911 (2007); published online EpubOct (10.1139/H07-079).
35. Hardie, D. G., Sakamoto, K., Ampk: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle. *Physiology* **21**, 48-60 (2006); published online EpubFeb (10.1152/physiol.00044.2005).
36. Ihlemann, J., Ploug, T., Hellsten, Y., Galbo, H., Effect of Tension on Contraction-Induced Glucose Transport in Rat Skeletal Muscle. *The American journal of physiology* **277**, E208-214 (1999); published online EpubAug (
37. Rasmussen, B. B., Winder, W. W., Effect of Exercise Intensity on Skeletal Muscle Malonyl-Coa and Acetyl-Coa Carboxylase. *Journal of applied physiology* **83**, 1104-1109 (1997); published online EpubOct (
38. Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M. F., Smith, J. T., Habinowski, S. A., Kaijser, L., Mu, J., Ljungqvist, O., Birnbaum, M. J., Witters, L. A., Thorell, A., Goodyear, L. J., Exercise Induces Isoform-Specific Increase in 5'amp-Activated Protein Kinase Activity in

- Human Skeletal Muscle. *Biochemical and biophysical research communications* **273**, 1150-1155 (2000); published online EpubJul 14 (10.1006/bbrc.2000.3073).
39. Stephens, T. J., Chen, Z. P., Canny, B. J., Michell, B. J., Kemp, B. E., McConell, G. K., Progressive Increase in Human Skeletal Muscle Ampkalpha2 Activity and Acc Phosphorylation During Exercise. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **282**, E688-694 (2002); published online EpubMar (10.1152/ajpendo.00101.2001).
40. Wojtaszewski, J. F., Nielsen, P., Hansen, B. F., Richter, E. A., Kiens, B., Isoform-Specific and Exercise Intensity-Dependent Activation of 5'-Amp-Activated Protein Kinase in Human Skeletal Muscle. *The Journal of physiology* **528 Pt 1**, 221-226 (2000); published online EpubOct 1 (
41. Chen, Z. P., McConell, G. K., Michell, B. J., Snow, R. J., Canny, B. J., Kemp, B. E., Ampk Signaling in Contracting Human Skeletal Muscle: Acetyl-Coa Carboxylase and No Synthase Phosphorylation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **279**, E1202-1206 (2000); published online EpubNov (
42. Nader, G. A., Esser, K. A., Intracellular Signaling Specificity in Skeletal Muscle in Response to Different Modes of Exercise. *Journal of applied physiology* **90**, 1936-1942 (2001); published online EpubMay (
43. Turinsky, J., Damrau-Abney, A., Akt Kinases and 2-Deoxyglucose Uptake in Rat Skeletal Muscles in Vivo: Study with Insulin and Exercise. *The American journal of physiology* **276**, R277-282 (1999); published online EpubJan (
44. Sakamoto, K., Aschenbach, W. G., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., Akt Signaling in Skeletal Muscle: Regulation by Exercise and Passive Stretch. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **285**, E1081-1088 (2003); published online EpubNov (10.1152/ajpendo.00228.2003).
45. Thorell, A., Hirshman, M. F., Nygren, J., Jorfeldt, L., Wojtaszewski, J. F., Dufresne, S. D., Horton, E. S., Ljungqvist, O., Goodyear, L. J., Exercise and Insulin Cause Glut-4 Translocation in Human Skeletal Muscle. *The American journal of physiology* **277**, E733-741 (1999); published online EpubOct (
46. Markuns, J. F., Wojtaszewski, J. F., Goodyear, L. J., Insulin and Exercise Decrease Glycogen Synthase Kinase-3 Activity by Different Mechanisms in Rat Skeletal Muscle. *The Journal of biological chemistry* **274**, 24896-24900 (1999); published online EpubAug 27 (

47. Wojtaszewski, J. F., Nielsen, P., Kiens, B., Richter, E. A., Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 in Human Skeletal Muscle: Effects of Food Intake and Bicycle Exercise. *Diabetes* **50**, 265-269 (2001); published online EpubFeb (
48. Canto, C., Auwerx, J., Pgc-1alpha, Sirt1 and Ampk, an Energy Sensing Network That Controls Energy Expenditure. *Current opinion in lipidology* **20**, 98-105 (2009); published online EpubApr (10.1097/MOL.0b013e328328d0a4).
49. Cohen, P., Frame, S., The Renaissance of Gsk3. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 769-776 (2001); published online EpubOct (10.1038/35096075).
50. Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., Spiegelman, B. M., Amp-Activated Protein Kinase (Ampk) Action in Skeletal Muscle Via Direct Phosphorylation of Pgc-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12017-12022 (2007); published online EpubJul 17 (10.1073/pnas.0705070104).
51. Mihaylova, M. M., Vasquez, D. S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P. D., Yu, R. T., Alvarez, J. G., Downes, M., Evans, R. M., Montminy, M., Shaw, R. J., Class Iia Histone Deacetylases Are Hormone-Activated Regulators of Foxo and Mammalian Glucose Homeostasis. *Cell* **145**, 607-621 (2011); published online EpubMay 13 (10.1016/j.cell.2011.03.043).
52. Thomson, D. M., Herway, S. T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J. D., Barrow, J. R., Winder, W. W., Amp-Activated Protein Kinase Phosphorylates Transcription Factors of the Creb Family. *Journal of applied physiology* **104**, 429-438 (2008); published online EpubFeb (10.1152/jappphysiol.00900.2007).
53. Lau, A. W., Liu, P., Inuzuka, H., Gao, D., Sirt1 Phosphorylation by Amp-Activated Protein Kinase Regulates P53 Acetylation. *American journal of cancer research* **4**, 245-255 (2014).
54. Lee, C. W., Wong, L. L., Tse, E. Y., Liu, H. F., Leong, V. Y., Lee, J. M., Hardie, D. G., Ng, I. O., Ching, Y. P., Ampk Promotes P53 Acetylation Via Phosphorylation and Inactivation of Sirt1 in Liver Cancer Cells. *Cancer research* **72**, 4394-4404 (2012); published online EpubSep 1 (10.1158/0008-5472.CAN-12-0429).
55. Dash, P. K., Karl, K. A., Colicos, M. A., Prywes, R., Kandel, E. R., Camp Response Element-Binding Protein Is Activated by Ca²⁺/Calmodulin- as Well as Camp-Dependent Protein Kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 5061-5065 (1991); published online EpubJun 1 (

56. Sheng, M., Thompson, M. A., Greenberg, M. E., Creb: A Ca²⁺-Regulated Transcription Factor Phosphorylated by Calmodulin-Dependent Kinases. *Science* **252**, 1427-1430 (1991); published online EpubJun 7 (
57. Sun, P., Enslin, H., Myung, P. S., Maurer, R. A., Differential Activation of Creb by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases Type Ii and Type Iv Involves Phosphorylation of a Site That Negatively Regulates Activity. *Genes & development* **8**, 2527-2539 (1994); published online EpubNov 1 (
58. Backs, J., Song, K., Bezprozvannaya, S., Chang, S., Olson, E. N., Cam Kinase Ii Selectively Signals to Histone Deacetylase 4 During Cardiomyocyte Hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1853-1864 (2006); published online EpubJul (10.1172/JCI27438).
59. Zhang, T., Kohlhaas, M., Backs, J., Mishra, S., Phillips, W., Dybkova, N., Chang, S., Ling, H., Bers, D. M., Maier, L. S., Olson, E. N., Brown, J. H., Camkiidelta Isoforms Differentially Affect Calcium Handling but Similarly Regulate Hdac/Mef2 Transcriptional Responses. *The Journal of biological chemistry* **282**, 35078-35087 (2007); published online EpubNov 30 (10.1074/jbc.M707083200).
60. Fluck, M., Booth, F. W., Waxham, M. N., Skeletal Muscle Camkii Enriches in Nuclei and Phosphorylates Myogenic Factor Srf at Multiple Sites. *Biochemical and biophysical research communications* **270**, 488-494 (2000); published online EpubApr 13 (10.1006/bbrc.2000.2457).
61. Holloszy, J. O., Regulation by Exercise of Skeletal Muscle Content of Mitochondria and Glut4. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **59 Suppl 7**, 5-18 (2008); published online EpubDec (
62. Narkar, V. A., Downes, M., Yu, R. T., Embler, E., Wang, Y. X., Banayo, E., Mihaylova, M. M., Nelson, M. C., Zou, Y., Juguilon, H., Kang, H., Shaw, R. J., Evans, R. M., Ampk and Ppardelta Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell* **134**, 405-415 (2008); published online EpubAug 8 (10.1016/j.cell.2008.06.051).
63. Folkesson, M., Mackey, A. L., Langberg, H., Oskarsson, E., Piehl-Aulin, K., Henriksson, J., Kadi, F., The Expression of Heat Shock Protein in Human Skeletal Muscle: Effects of Muscle Fibre Phenotype and Training Background. *Acta physiologica* 10.1111/apha.12124, (2013); published online EpubMay 27 (10.1111/apha.12124).
64. Ross, A., Leveritt, M., Long-Term Metabolic and Skeletal Muscle Adaptations to Short-Sprint Training: Implications for Sprint Training and Tapering. *Sports medicine* **31**, 1063-1082 (2001).

65. Locke, M., Noble, E. G., Stress Proteins: The Exercise Response. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* **20**, 155-167 (1995); published online EpubJun (
66. Inaguma, Y., Goto, S., Shinohara, H., Hasegawa, K., Ohshima, K., Kato, K., Physiological and Pathological Changes in Levels of the Two Small Stress Proteins, Hsp27 and Alpha B Crystallin, in Rat Hindlimb Muscles. *Journal of biochemistry* **114**, 378-384 (1993); published online EpubSep (
67. Ornatsky, O. I., Connor, M. K., Hood, D. A., Expression of Stress Proteins and Mitochondrial Chaperonins in Chronically Stimulated Skeletal Muscle. *The Biochemical journal* **311 (Pt 1)**, 119-123 (1995); published online EpubOct 1 (
68. Thompson, H. S., Maynard, E. B., Morales, E. R., Scordilis, S. P., Exercise-Induced Hsp27, Hsp70 and Mapk Responses in Human Skeletal Muscle. *Acta physiologica Scandinavica* **178**, 61-72 (2003); published online EpubMay (10.1046/j.1365-201X.2003.01112.x).
69. Ji, L. L., Antioxidant Signaling in Skeletal Muscle: A Brief Review. *Experimental gerontology* **42**, 582-593 (2007); published online EpubJul (10.1016/j.exger.2007.03.002).
70. Ji, L. L., Modulation of Skeletal Muscle Antioxidant Defense by Exercise: Role of Redox Signaling. *Free radical biology & medicine* **44**, 142-152 (2008); published online EpubJan 15 (10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.031).
71. Majerczak, J., Rychlik, B., Grzelak, A., Grzmil, P., Karasinski, J., Pierzchalski, P., Pulaski, L., Bartosz, G., Zoladz, J. A., Effect of 5-Week Moderate Intensity Endurance Training on the Oxidative Stress, Muscle Specific Uncoupling Protein (Ucp3) and Superoxide Dismutase (Sod2) Contents in Vastus Lateralis of Young, Healthy Men. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **61**, 743-751 (2010); published online EpubDec (
72. Fritsche, L., Weigert, C., Haring, H. U., Lehmann, R., How Insulin Receptor Substrate Proteins Regulate the Metabolic Capacity of the Liver--Implications for Health and Disease. *Current medicinal chemistry* **15**, 1316-1329 (2008).
73. Souza Pauli, L. S., Ropelle, E. C., de Souza, C. T., Cintra, D. E., da Silva, A. S., de Almeida Rodrigues, B., de Moura, L. P., Marinho, R., de Oliveira, V., Katashima, C. K., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., Exercise Training Decreases Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-3 Expression and Suppresses Hepatic Gluconeogenesis in Obese Mice.

- The Journal of physiology* **592**, 1325-1340 (2014); published online EpubMar 15 (10.1113/jphysiol.2013.264002).
74. Wahren, J., Ekberg, K., Splanchnic Regulation of Glucose Production. *Annual review of nutrition* **27**, 329-345 (2007)10.1146/annurev.nutr.27.061406.093806).
75. Sherwin, R. S., Role of the Liver in Glucose Homeostasis. *Diabetes care* **3**, 261-265 (1980); published online EpubMar-Apr (
76. Nordlie, R. C., Foster, J. D., Lange, A. J., Regulation of Glucose Production by the Liver. *Annual review of nutrition* **19**, 379-406 (1999)10.1146/annurev.nutr.19.1.379).
77. Klover, P. J., Mooney, R. A., Hepatocytes: Critical for Glucose Homeostasis. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 753-758 (2004); published online EpubMay (
78. Mayr, B., Montminy, M., Transcriptional Regulation by the Phosphorylation-Dependent Factor Creb. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 599-609 (2001); published online EpubAug (10.1038/35085068).
79. Jitrapakdee, S., Transcription Factors and Coactivators Controlling Nutrient and Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 33-45 (2012); published online EpubJan (10.1016/j.biocel.2011.10.001).
80. Koo, S. H., Satoh, H., Herzig, S., Lee, C. H., Hedrick, S., Kulkarni, R., Evans, R. M., Olefsky, J., Montminy, M., Pgc-1 Promotes Insulin Resistance in Liver through Ppar-Alpha-Dependent Induction of Trb-3. *Nature medicine* **10**, 530-534 (2004); published online EpubMay (10.1038/nm1044).
81. Utter, M. F., Keech, D. B., Formation of Oxaloacetate from Pyruvate and Carbon Dioxide. *The Journal of biological chemistry* **235**, PC17-18 (1960); published online EpubMay (
82. Hanson, R. W., Reshef, L., Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (Gtp) Gene Expression. *Annual review of biochemistry* **66**, 581-611 (1997)10.1146/annurev.biochem.66.1.581).
83. Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., Dumon, H., Liver Lipid Metabolism. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **92**, 272-283 (2008); published online EpubJun (10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x).
84. Desvergne, B., Michalik, L., Wahli, W., Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiological reviews* **86**, 465-514 (2006); published online EpubApr (10.1152/physrev.00025.2005).

85. Zhang, S., Hulver, M. W., McMillan, R. P., Cline, M. A., Gilbert, E. R., The Pivotal Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Metabolic Flexibility. *Nutrition & metabolism* **11**, 10 (2014)10.1186/1743-7075-11-10).
86. Hakvoort, T. B., Moerland, P. D., Frijters, R., Sokolovic, A., Labruyere, W. T., Vermeulen, J. L., Ver Loren van Themaat, E., Breit, T. M., Wittink, F. R., van Kampen, A. H., Verhoeven, A. J., Lamers, W. H., Sokolovic, M., Interorgan Coordination of the Murine Adaptive Response to Fasting. *The Journal of biological chemistry* **286**, 16332-16343 (2011); published online EpubMay 6 (10.1074/jbc.M110.216986).
87. Galgani, J. E., Moro, C., Ravussin, E., Metabolic Flexibility and Insulin Resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **295**, E1009-1017 (2008); published online EpubNov (10.1152/ajpendo.90558.2008).
88. Wu, P., Blair, P. V., Sato, J., Jaskiewicz, J., Popov, K. M., Harris, R. A., Starvation Increases the Amount of Pyruvate Dehydrogenase Kinase in Several Mammalian Tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* **381**, 1-7 (2000); published online EpubSep 1 (10.1006/abbi.2000.1946).
89. Tao, R., Xiong, X., Harris, R. A., White, M. F., Dong, X. C., Genetic Inactivation of Pyruvate Dehydrogenase Kinases Improves Hepatic Insulin Resistance Induced Diabetes. *PloS one* **8**, e71997 (2013)10.1371/journal.pone.0071997).
90. Lewitt, M. S., Denyer, G. S., Cooney, G. J., Baxter, R. C., Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 Modulates Blood Glucose Levels. *Endocrinology* **129**, 2254-2256 (1991); published online EpubOct (10.1210/endo-129-4-2254).
91. Rajwani, A., Ezzat, V., Smith, J., Yuldasheva, N. Y., Duncan, E. R., Gage, M., Cubbon, R. M., Kahn, M. B., Imrie, H., Abbas, A., Viswambharan, H., Aziz, A., Sukumar, P., Vidal-Puig, A., Sethi, J. K., Xuan, S., Shah, A. M., Grant, P. J., Porter, K. E., Kearney, M. T., Wheatcroft, S. B., Increasing Circulating Igfbp1 Levels Improves Insulin Sensitivity, Promotes Nitric Oxide Production, Lowers Blood Pressure, and Protects against Atherosclerosis. *Diabetes* **61**, 915-924 (2012); published online EpubApr (10.2337/db11-0963).
92. Cohen, P., Fielder, P. J., Hasegawa, Y., Frisch, H., Giudice, L. C., Rosenfeld, R. G., Clinical Aspects of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Acta endocrinologica* **124 Suppl 2**, 74-85 (1991).
93. Katz, L. E., Satin-Smith, M. S., Collett-Solberg, P., Baker, L., Stanley, C. A., Cohen, P., Dual Regulation of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 Levels by Insulin and

- Cortisol During Fasting. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **83**, 4426-4430 (1998); published online EpubDec (10.1210/jcem.83.12.5347).
94. Powell, D. R., Suwanichkul, A., Cabbage, M. L., DePaolis, L. A., Snuggs, M. B., Lee, P. D., Insulin Inhibits Transcription of the Human Gene for Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1. *The Journal of biological chemistry* **266**, 18868-18876 (1991); published online EpubOct 5 (
95. Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., Sandusky, G. E., Hammond, L. J., Moyers, J. S., Owens, R. A., Gromada, J., Brozinick, J. T., Hawkins, E. D., Wroblewski, V. J., Li, D. S., Mehrbod, F., Jaskunas, S. R., Shanafelt, A. B., Fgf-21 as a Novel Metabolic Regulator. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1627-1635 (2005); published online EpubJun (10.1172/JCI23606).
96. Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., Itoh, N., Identification of a Novel Fgf, Fgf-21, Preferentially Expressed in the Liver. *Biochimica et biophysica acta* **1492**, 203-206 (2000); published online EpubJun 21 (
97. Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., Walsh, K., Fgf21 Is an Akt-Regulated Myokine. *FEBS letters* **582**, 3805-3810 (2008); published online EpubNov 12 (10.1016/j.febslet.2008.10.021).
98. Wentz, W., Efanov, A. M., Brenner, M., Kharitonov, A., Koster, A., Sandusky, G. E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., Gromada, J., Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic Beta-Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways. *Diabetes* **55**, 2470-2478 (2006); published online EpubSep (10.2337/db05-1435).
99. Zhang, X., Yeung, D. C., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z. G., Liu, F., Wong, R. L., Chow, W. S., Tso, A. W., Lam, K. S., Xu, A., Serum Fgf21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated with the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes* **57**, 1246-1253 (2008); published online EpubMay (10.2337/db07-1476).
100. Pothoff, M. J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., Mohammadi, M., Finck, B. N., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A., Burgess, S. C., Fgf21 Induces Pgc-1alpha and Regulates Carbohydrate and Fatty Acid Metabolism During the Adaptive Starvation Response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 10853-10858 (2009); published online EpubJun 30 (10.1073/pnas.0904187106).
101. Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., Moller, D. E., Kharitonov, A., Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice.

- Endocrinology* **149**, 6018-6027 (2008); published online EpubDec (10.1210/en.2008-0816).
102. Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdes, P., Aguilar-Salinas, C. A., Cuevas-Ramos, G., Cuevas-Sosa, A. A., Gomez-Perez, F. J., The Role of Fibroblast Growth Factor 21 (Fgf21) on Energy Balance, Glucose and Lipid Metabolism. *Current diabetes reviews* **5**, 216-220 (2009); published online EpubNov (
103. Galzie, Z., Kinsella, A. R., Smith, J. A., Fibroblast Growth Factors and Their Receptors. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **75**, 669-685 (1997).
104. Powers, C. J., McLeskey, S. W., Wellstein, A., Fibroblast Growth Factors, Their Receptors and Signaling. *Endocrine-related cancer* **7**, 165-197 (2000); published online EpubSep (
105. Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J. D., Murison, J. G., Identification of a New Fibroblast Growth Factor Receptor, Fgfr5. *Gene* **271**, 171-182 (2001); published online EpubJun 27 (
106. Kharitononkov, A., Dunbar, J. D., Bina, H. A., Bright, S., Moyers, J. S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S. F., Knierman, M. D., Hale, J. E., Coskun, T., Shanafelt, A. B., Fgf-21/Fgf-21 Receptor Interaction and Activation Is Determined by Betaklotho. *Journal of cellular physiology* **215**, 1-7 (2008); published online EpubApr (10.1002/jcp.21357).
107. Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A. S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K. P., Kliewer, S. A., Kuro-o, M., Tissue-Specific Expression of Betaklotho and Fibroblast Growth Factor (Fgf) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of Fgf19 and Fgf21. *The Journal of biological chemistry* **282**, 26687-26695 (2007); published online EpubSep 14 (10.1074/jbc.M704165200).
108. Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Betaklotho Is Required for Metabolic Activity of Fibroblast Growth Factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7432-7437 (2007); published online EpubMay 1 (10.1073/pnas.0701600104).
109. Cuevas-Ramos, D., Aguilar-Salinas, C. A., Gomez-Perez, F. J., Metabolic Actions of Fibroblast Growth Factor 21. *Current opinion in pediatrics* **24**, 523-529 (2012); published online EpubAug (10.1097/MOP.0b013e3283557d22).
110. Uebanso, T., Taketani, Y., Yamamoto, H., Amo, K., Ominami, H., Arai, H., Takei, Y., Masuda, M., Tanimura, A., Harada, N., Yamanaka-Okumura, H., Takeda, E.,

- Paradoxical Regulation of Human Fgf21 by Both Fasting and Feeding Signals: Is Fgf21 a Nutritional Adaptation Factor? *PloS one* **6**, e22976 (2011)10.1371/journal.pone.0022976).
111. Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K., Newgard, C. B., Spiegelman, B. M., Control of Hepatic Gluconeogenesis through the Transcriptional Coactivator Pgc-1. *Nature* **413**, 131-138 (2001); published online EpubSep 13 (10.1038/35093050).
112. Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Liver-Specific Mrna for Insig-2 Down-Regulated by Insulin: Implications for Fatty Acid Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 3155-3160 (2003); published online EpubMar 18 (10.1073/pnas.0130116100).
113. Zhang, Y., Lei, T., Huang, J. F., Wang, S. B., Zhou, L. L., Yang, Z. Q., Chen, X. D., The Link between Fibroblast Growth Factor 21 and Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c During Lipogenesis in Hepatocytes. *Molecular and cellular endocrinology* **342**, 41-47 (2011); published online EpubAug 6 (10.1016/j.mce.2011.05.003).
114. Fisher, F. M., Estall, J. L., Adams, A. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Flier, J. S., Kharitonov, A., Spiegelman, B. M., Maratos-Flier, E., Integrated Regulation of Hepatic Metabolism by Fibroblast Growth Factor 21 (Fgf21) in Vivo. *Endocrinology* **152**, 2996-3004 (2011); published online EpubAug (10.1210/en.2011-0281).
115. Thamer, C., Machann, J., Stefan, N., Haap, M., Schafer, S., Brenner, S., Kantartzis, K., Claussen, C., Schick, F., Haring, H., Fritsche, A., High Visceral Fat Mass and High Liver Fat Are Associated with Resistance to Lifestyle Intervention. *Obesity* **15**, 531-538 (2007); published online EpubFeb (10.1038/oby.2007.568).
116. Hoene, M., Lehmann, R., Hennige, A. M., Pohl, A. K., Haring, H. U., Schleicher, E. D., Weigert, C., Acute Regulation of Metabolic Genes and Insulin Receptor Substrates in the Liver of Mice by One Single Bout of Treadmill Exercise. *The Journal of physiology* **587**, 241-252 (2009); published online EpubJan 15 (10.1113/jphysiol.2008.160275).
117. Hoene, M., Weigert, C., The Stress Response of the Liver to Physical Exercise. *Exercise immunology review* **16**, 163-183 (2010).
118. Aoi, W., Ichiishi, E., Sakamoto, N., Tsujimoto, A., Tokuda, H., Yoshikawa, T., Effect of Exercise on Hepatic Gene Expression in Rats: A Microarray Analysis. *Life sciences* **75**, 3117-3128 (2004); published online EpubNov 12 (10.1016/j.lfs.2004.04.053).
119. Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Cintra, D. E., Frederico, M. J., de Pinho, R. A., Velloso, L. A., De Souza, C. T., Acute Exercise Modulates the Foxo1/Pgc-1alpha Pathway in the Liver

- of Diet-Induced Obesity Rats. *The Journal of physiology* **587**, 2069-2076 (2009); published online EpubMay 1 (10.1113/jphysiol.2008.164202).
120. Zhang, S., Liu, Y., Li, Q., Dong, X., Hu, H., Hu, R., Ye, H., Wu, Y., Hu, R., Li, Y., Exercise Improved Rat Metabolism by Raising Ppar-Alpha. *International journal of sports medicine* **32**, 568-573 (2011); published online EpubAug (10.1055/s-0031-1271755).
121. Banzet, S., Koulmann, N., Simler, N., Sanchez, H., Chapot, R., Serrurier, B., Peinnequin, A., Bigard, X., Control of Gluconeogenic Genes During Intense/Prolonged Exercise: Hormone-Independent Effect of Muscle-Derived Il-6 on Hepatic Tissue and Pepck Mrna. *Journal of applied physiology* **107**, 1830-1839 (2009); published online EpubDec (10.1152/jappphysiol.00739.2009).
122. Wilson, D. O., Johnson, P., Exercise Modulates Antioxidant Enzyme Gene Expression in Rat Myocardium and Liver. *Journal of applied physiology* **88**, 1791-1796 (2000); published online EpubMay (
123. Carlson, C. L., Winder, W. W., Liver Amp-Activated Protein Kinase and Acetyl-Coa Carboxylase During and after Exercise. *Journal of applied physiology* **86**, 669-674 (1999); published online EpubFeb (
124. Park, H., Kaushik, V. K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N. B., Saha, A. K., Coordinate Regulation of Malonyl-Coa Decarboxylase, Sn-Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, and Acetyl-Coa Carboxylase by Amp-Activated Protein Kinase in Rat Tissues in Response to Exercise. *The Journal of biological chemistry* **277**, 32571-32577 (2002); published online EpubSep 6 (10.1074/jbc.M201692200).
125. Camacho, R. C., Donahue, E. P., James, F. D., Berglund, E. D., Wasserman, D. H., Energy State of the Liver During Short-Term and Exhaustive Exercise in C57bl/6j Mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **290**, E405-408 (2006); published online EpubMar (10.1152/ajpendo.00385.2005).
126. Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D., Hardie, D. G., Characterization of the Amp-Activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates Amp-Activated Protein Kinase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 27879-27887 (1996); published online EpubNov 1 (
127. Kimball, S. R., Siegfried, B. A., Jefferson, L. S., Glucagon Represses Signaling through the Mammalian Target of Rapamycin in Rat Liver by Activating Amp-Activated Protein

- Kinase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 54103-54109 (2004); published online EpubDec 24 (10.1074/jbc.M410755200).
128. Junttila, M. R., Evan, G. I., P53--a Jack of All Trades but Master of None. *Nature reviews. Cancer* **9**, 821-829 (2009); published online EpubNov (10.1038/nrc2728).
129. Malmlof, M., Roudier, E., Hogberg, J., Stenius, U., Mek-Erk-Mediated Phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in Hepatocytes. Mdm2 Is Activated in Response to Inhibited Akt Signaling. *The Journal of biological chemistry* **282**, 2288-2296 (2007); published online EpubJan 26 (10.1074/jbc.M604953200).
130. Hoene, M., Franken, H., Fritsche, L., Lehmann, R., Pohl, A. K., Haring, H. U., Zell, A., Schleicher, E. D., Weigert, C., Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (Mapk) Signalling Pathway in the Liver of Mice Is Related to Plasma Glucose Levels after Acute Exercise. *Diabetologia* **53**, 1131-1141 (2010); published online EpubJun (10.1007/s00125-010-1666-3).
131. Fiebig, R. G., Hollander, J. M., Ji, L. L., Exercise Down-Regulates Hepatic Fatty Acid Synthase in Streptozotocin-Treated Rats. *The Journal of nutrition* **131**, 2252-2259 (2001); published online EpubSep (
132. Griffiths, M. A., Fiebig, R., Gore, M. T., Baker, D. H., Esser, K., Oscai, L., Ji, L. L., Exercise Down-Regulates Hepatic Lipogenic Enzymes in Food-Deprived and Refed Rats. *The Journal of nutrition* **126**, 1959-1971 (1996); published online EpubAug (
133. Huang, H., Iida, K. T., Sone, H., Ajisaka, R., The Regulation of Adiponectin Receptors Expression by Acute Exercise in Mice. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **115**, 417-422 (2007); published online EpubJul (10.1055/s-2007-981660).
134. Radak, Z., Chung, H. Y., Naito, H., Takahashi, R., Jung, K. J., Kim, H. J., Goto, S., Age-Associated Increase in Oxidative Stress and Nuclear Factor Kappab Activation Are Attenuated in Rat Liver by Regular Exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 749-750 (2004); published online EpubApr (10.1096/fj.03-0509fje).
135. Navarro, A., Gomez, C., Lopez-Cepero, J. M., Boveris, A., Beneficial Effects of Moderate Exercise on Mice Aging: Survival, Behavior, Oxidative Stress, and Mitochondrial Electron Transfer. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **286**, R505-511 (2004); published online EpubMar (10.1152/ajpregu.00208.2003).

136. Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B. M., A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839 (1998); published online EpubMar 20 (
137. Liang, H., Ward, W. F., Pgc-1alpha: A Key Regulator of Energy Metabolism. *Advances in physiology education* **30**, 145-151 (2006); published online EpubDec (10.1152/advan.00052.2006).
138. Puigserver, P., Spiegelman, B. M., Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1 Alpha (Pgc-1 Alpha): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocrine reviews* **24**, 78-90 (2003); published online EpubFeb (10.1210/er.2002-0012).
139. Michael, L. F., Wu, Z., Cheatham, R. B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J. J., Kelly, D. P., Spiegelman, B. M., Restoration of Insulin-Sensitive Glucose Transporter (Glut4) Gene Expression in Muscle Cells by the Transcriptional Coactivator Pgc-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3820-3825 (2001); published online EpubMar 27 (10.1073/pnas.061035098).
140. Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., Spiegelman, B. M., Insulin-Regulated Hepatic Gluconeogenesis through Foxo1-Pgc-1alpha Interaction. *Nature* **423**, 550-555 (2003); published online EpubMay 29 (10.1038/nature01667).
141. Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., Montminy, M., Creb Regulates Hepatic Gluconeogenesis through the Coactivator Pgc-1. *Nature* **413**, 179-183 (2001); published online EpubSep 13 (10.1038/35093131).
142. Rodgers, J. T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z., Puigserver, P., Metabolic Adaptations through the Pgc-1 Alpha and Sirt1 Pathways. *FEBS letters* **582**, 46-53 (2008); published online EpubJan 9 (10.1016/j.febslet.2007.11.034).
143. Lerin, C., Rodgers, J. T., Kalume, D. E., Kim, S. H., Pandey, A., Puigserver, P., Gcn5 Acetyltransferase Complex Controls Glucose Metabolism through Transcriptional Repression of Pgc-1alpha. *Cell metabolism* **3**, 429-438 (2006); published online EpubJun (10.1016/j.cmet.2006.04.013).
144. Leone, T. C., Lehman, J. J., Finck, B. N., Schaeffer, P. J., Wende, A. R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D. F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., Chen, Z., Holloszy, J. O., Medeiros, D. M., Schmidt, R. E., Saffitz, J. E., Abel, E. D., Semenkovich, C. F., Kelly, D. P., Pgc-1alpha Deficiency Causes Multi-System Energy

- Metabolic Derangements: Muscle Dysfunction, Abnormal Weight Control and Hepatic Steatosis. *PLoS biology* **3**, e101 (2005); published online EpubApr (10.1371/journal.pbio.0030101).
145. Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B. M., Metabolic Control through the Pgc-1 Family of Transcription Coactivators. *Cell metabolism* **1**, 361-370 (2005); published online EpubJun (10.1016/j.cmet.2005.05.004).
146. Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J. M., Tardivel, A., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., Metzger, D., Pgc1alpha Expression Is Controlled in Skeletal Muscles by Pparbeta, Whose Ablation Results in Fiber-Type Switching, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Cell metabolism* **4**, 407-414 (2006); published online EpubNov (10.1016/j.cmet.2006.10.003).
147. Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z. P., Lecker, S. H., Goldberg, A. L., Spiegelman, B. M., Pgc-1alpha Protects Skeletal Muscle from Atrophy by Suppressing Foxo3 Action and Atrophy-Specific Gene Transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16260-16265 (2006); published online EpubOct 31 (10.1073/pnas.0607795103).
148. 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., Transcriptional Co-Activator Pgc-1 Alpha Drives the Formation of Slow-Twitch Muscle Fibres. *Nature* **418**, 797-801 (2002); published online EpubAug 15 (10.1038/nature00904).
149. Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P. T., Spiegelman, B. M., An Autoregulatory Loop Controls Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1alpha Expression in Muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7111-7116 (2003); published online EpubJun 10 (10.1073/pnas.1232352100).
150. Fernandez-Marcos, P. J., Auwerx, J., Regulation of Pgc-1alpha, a Nodal Regulator of Mitochondrial Biogenesis. *The American journal of clinical nutrition* **93**, 884S-890 (2011); published online EpubApr (10.3945/ajcn.110.001917).
151. Akimoto, T., Pohnert, S. C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P. B., Williams, R. S., Yan, Z., Exercise Stimulates Pgc-1alpha Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the P38 Mapk Pathway. *The Journal of biological chemistry* **280**, 19587-19593 (2005); published online EpubMay 20 (10.1074/jbc.M408862200).

-
152. Haase, T. N., Ringholm, S., Leick, L., Bienso, R. S., Küllerich, K., Johansen, S., Nielsen, M. M., Wojtaszewski, J. F., Hidalgo, J., Pedersen, P. A., Pilegaard, H., Role of Pgc-1alpha in Exercise and Fasting-Induced Adaptations in Mouse Liver. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **301**, R1501-1509 (2011); published online EpubNov (10.1152/ajpregu.00775.2010).
153. Jenning, E. H., Schoonjans, K., Auwerx, J., Reversible Acetylation of Pgc-1: Connecting Energy Sensors and Effectors to Guarantee Metabolic Flexibility. *Oncogene* **29**, 4617-4624 (2010); published online EpubAug 19 (10.1038/onc.2010.206).
154. Li, X., Monks, B., Ge, Q., Birnbaum, M. J., Akt/Pkb Regulates Hepatic Metabolism by Directly Inhibiting Pgc-1alpha Transcription Coactivator. *Nature* **447**, 1012-1016 (2007); published online EpubJun 21 (10.1038/nature05861).
155. Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J. C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F. J., Spiegelman, B. M., Regulation of Hepatic Fasting Response by Pparggamma Coactivator-1alpha (Pgc-1): Requirement for Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha in Gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4012-4017 (2003); published online EpubApr 1 (10.1073/pnas.0730870100).
156. Nemoto, S., Fergusson, M. M., Finkel, T., Sirt1 Functionally Interacts with the Metabolic Regulator and Transcriptional Coactivator Pgc-1{Alpha}. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16456-16460 (2005); published online EpubApr 22 (10.1074/jbc.M501485200).
157. Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., Puigserver, P., Nutrient Control of Glucose Homeostasis through a Complex of Pgc-1alpha and Sirt1. *Nature* **434**, 113-118 (2005); published online EpubMar 3 (10.1038/nature03354).
158. Rodgers, J. T., Puigserver, P., Fasting-Dependent Glucose and Lipid Metabolic Response through Hepatic Sirtuin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12861-12866 (2007); published online EpubJul 31 (10.1073/pnas.0702509104).
159. Erion, D. M., Yonemitsu, S., Nie, Y., Nagai, Y., Gillum, M. P., Hsiao, J. J., Iwasaki, T., Stark, R., Weismann, D., Yu, X. X., Murray, S. F., Bhanot, S., Monia, B. P., Horvath, T. L., Gao, Q., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Sirt1 Knockdown in Liver Decreases Basal Hepatic Glucose Production and Increases Hepatic Insulin Responsiveness in Diabetic Rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 11288-11293 (2009); published online EpubJul 7 (10.1073/pnas.0812931106).
-

160. Cargnello, M., Roux, P. P., Activation and Function of the Mapks and Their Substrates, the Mapk-Activated Protein Kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **75**, 50-83 (2011); published online EpubMar (10.1128/MMBR.00031-10).
161. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L., Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module from Yeast to Human. *Physiological reviews* **79**, 143-180 (1999); published online EpubJan (
162. Kramer, H. F., Goodyear, L. J., Exercise, Mapk, and Nf-Kappab Signaling in Skeletal Muscle. *Journal of applied physiology* **103**, 388-395 (2007); published online EpubJul (10.1152/jappphysiol.00085.2007).
163. Kyriakis, J. M., Avruch, J., Mammalian Mapk Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. *Physiological reviews* **92**, 689-737 (2012); published online EpubApr (10.1152/physrev.00028.2011).
164. Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., Caboche, J., Elk-1 a Transcription Factor with Multiple Facets in the Brain. *Frontiers in neuroscience* **5**, 35 (2011)10.3389/fnins.2011.00035).
165. Raman, M., Chen, W., Cobb, M. H., Differential Regulation and Properties of Mapks. *Oncogene* **26**, 3100-3112 (2007); published online EpubMay 14 (10.1038/sj.onc.1210392).
166. Fremin, C., Meloche, S., From Basic Research to Clinical Development of Mek1/2 Inhibitors for Cancer Therapy. *Journal of hematology & oncology* **3**, 8 (2010)10.1186/1756-8722-3-8).
167. Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M. H., Map Kinases. *Chemical reviews* **101**, 2449-2476 (2001); published online EpubAug (
168. Yoon, S., Seger, R., The Extracellular Signal-Regulated Kinase: Multiple Substrates Regulate Diverse Cellular Functions. *Growth factors* **24**, 21-44 (2006); published online EpubMar (10.1080/02699050500284218).
169. Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Kempf, R. C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M. C., Donia, M., Fagone, P., Malaponte, G., Nicoletti, F., Libra, M., Milella, M., Tafuri, A., Bonati, A., Basecke, J., Cocco, L., Evangelisti, C., Martelli, A. M., Montalto, G., Cervello, M., McCubrey, J. A., Roles of the Raf/Mek/Erk and Pi3k/Pten/Akt/Mtor Pathways in Controlling Growth and Sensitivity to Therapy-Implications for Cancer and Aging. *Aging* **3**, 192-222 (2011); published online EpubMar (

170. Davis, R. J., Signal Transduction by the Jnk Group of Map Kinases. *Cell* **103**, 239-252 (2000); published online EpubOct 13 (
171. Kyriakis, J. M., Avruch, J., Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological reviews* **81**, 807-869 (2001); published online EpubApr (
172. Zhang, T., Inesta-Vaquera, F., Niepel, M., Zhang, J., Ficarro, S. B., Machleidt, T., Xie, T., Marto, J. A., Kim, N., Sim, T., Laughlin, J. D., Park, H., LoGrasso, P. V., Patricelli, M., Nomanbhoy, T. K., Sorger, P. K., Alessi, D. R., Gray, N. S., Discovery of Potent and Selective Covalent Inhibitors of Jnk. *Chemistry & biology* **19**, 140-154 (2012); published online EpubJan 27 (10.1016/j.chembiol.2011.11.010).
173. Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M., Cohen, P., Synergistic Activation of Sapk1/Jnk1 by Two Map Kinase Kinases in Vitro. *Current biology : CB* **8**, 1387-1390 (1998); published online EpubDec 17-31 (
174. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M., Identification of an Oncoprotein- and Uv-Responsive Protein Kinase That Binds and Potentiates the C-Jun Activation Domain. *Genes & development* **7**, 2135-2148 (1993); published online EpubNov (
175. Weston, C. R., Davis, R. J., The Jnk Signal Transduction Pathway. *Current opinion in genetics & development* **12**, 14-21 (2002); published online EpubFeb (
176. Bogoyevitch, M. A., The Isoform-Specific Functions of the C-Jun N-Terminal Kinases (Jnks): Differences Revealed by Gene Targeting. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**, 923-934 (2006); published online EpubSep (10.1002/bies.20458).
177. Sharma, N., Bhat, A. D., Kassa, A. D., Xiao, Y., Arias, E. B., Cartee, G. D., Improved Insulin Sensitivity with Calorie Restriction Does Not Require Reduced Jnk1/2, P38, or Erk1/2 Phosphorylation in Skeletal Muscle of 9-Month-Old Rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **302**, R126-136 (2012); published online EpubJan 1 (10.1152/ajpregu.00372.2011).
178. Widegren, U., Ryder, J. W., Zierath, J. R., Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction in Skeletal Muscle: Effects of Exercise and Muscle Contraction. *Acta physiologica Scandinavica* **172**, 227-238 (2001); published online EpubJul (10.1046/j.1365-201x.2001.00855.x).
179. Ruiz-Bonilla, V., Perdiguero, E., Gresh, L., Serrano, A. L., Zamora, M., Sousa-Victor, P., Jardi, M., Wagner, E. F., Munoz-Canoves, P., Efficient Adult Skeletal Muscle

- Regeneration in Mice Deficient in P38beta, P38gamma and P38delta Map Kinases. *Cell cycle* **7**, 2208-2214 (2008); published online EpubJul 15 (
180. Creer, A., Gallagher, P., Slivka, D., Jemiolo, B., Fink, W., Trappe, S., Influence of Muscle Glycogen Availability on Erk1/2 and Akt Signaling after Resistance Exercise in Human Skeletal Muscle. *Journal of applied physiology* **99**, 950-956 (2005); published online EpubSep (10.1152/jappphysiol.00110.2005).
181. Karlsson, H. K., Nilsson, P. A., Nilsson, J., Chibalin, A. V., Zierath, J. R., Blomstrand, E., Branched-Chain Amino Acids Increase P70s6k Phosphorylation in Human Skeletal Muscle after Resistance Exercise. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **287**, E1-7 (2004); published online EpubJul (10.1152/ajpendo.00430.2003).
182. Williamson, D., Gallagher, P., Harber, M., Hollon, C., Trappe, S., Mitogen-Activated Protein Kinase (Mapk) Pathway Activation: Effects of Age and Acute Exercise on Human Skeletal Muscle. *The Journal of physiology* **547**, 977-987 (2003); published online EpubMar 15 (10.1113/jphysiol.2002.036673).
183. Widegren, U., Wretman, C., Lionikas, A., Hedin, G., Henriksson, J., Influence of Exercise Intensity on Erk/Map Kinase Signalling in Human Skeletal Muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **441**, 317-322 (2000); published online EpubDec (
184. Widegren, U., Jiang, X. J., Krook, A., Chibalin, A. V., Bjornholm, M., Tally, M., Roth, R. A., Henriksson, J., Wallberg-henriksson, H., Zierath, J. R., Divergent Effects of Exercise on Metabolic and Mitogenic Signaling Pathways in Human Skeletal Muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**, 1379-1389 (1998); published online EpubOct (
185. Yu, M., Stepto, N. K., Chibalin, A. V., Fryer, L. G., Carling, D., Krook, A., Hawley, J. A., Zierath, J. R., Metabolic and Mitogenic Signal Transduction in Human Skeletal Muscle after Intense Cycling Exercise. *The Journal of physiology* **546**, 327-335 (2003); published online EpubJan 15 (
186. Aronson, D., Violan, M. A., Dufresne, S. D., Zangen, D., Fielding, R. A., Goodyear, L. J., Exercise Stimulates the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Human Skeletal Muscle. *The Journal of clinical investigation* **99**, 1251-1257 (1997); published online EpubMar 15 (10.1172/JCI119282).
187. Aronson, D., Dufresne, S. D., Goodyear, L. J., Contractile Activity Stimulates the C-Jun N_h2-Terminal Kinase Pathway in Rat Skeletal Muscle. *The Journal of biological chemistry* **272**, 25636-25640 (1997); published online EpubOct 10 (

188. Dufresne, S. D., BJORBAEK, C., EL-HASCHIMI, K., ZHAO, Y., ASCHENBACH, W. G., MOLLER, D. E., GOODYEAR, L. J., Altered Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling and Glycogen Metabolism in Skeletal Muscle from P90 Ribosomal S6 Kinase 2 Knockout Mice. *Molecular and cellular biology* **21**, 81-87 (2001); published online EpubJan (10.1128/MCB.21.1.81-87.2001).
189. Goodyear, L. J., Chang, P. Y., Sherwood, D. J., Dufresne, S. D., Moller, D. E., Effects of Exercise and Insulin on Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in Rat Skeletal Muscle. *The American journal of physiology* **271**, E403-408 (1996); published online EpubAug (
190. Hayashi, T., Hirshman, M. F., Dufresne, S. D., Goodyear, L. J., Skeletal Muscle Contractile Activity in Vitro Stimulates Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *The American journal of physiology* **277**, C701-707 (1999); published online EpubOct (
191. Leng, Y., Steiler, T. L., Zierath, J. R., Effects of Insulin, Contraction, and Phorbol Esters on Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Skeletal Muscle from Lean and Ob/Ob Mice. *Diabetes* **53**, 1436-1444 (2004); published online EpubJun (
192. Wretman, C., Widegren, U., Lionikas, A., Westerblad, H., Henriksson, J., Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling Pathways by Isometric Contractions in Isolated Slow- and Fast-Twitch Rat Skeletal Muscle. *Acta physiologica Scandinavica* **170**, 45-49 (2000); published online EpubSep (10.1046/j.1365-201x.2000.00752.x).
193. Aronson, D., Boppart, M. D., Dufresne, S. D., Fielding, R. A., Goodyear, L. J., Exercise Stimulates C-Jun N^h2 Kinase Activity and C-Jun Transcriptional Activity in Human Skeletal Muscle. *Biochemical and biophysical research communications* **251**, 106-110 (1998); published online EpubOct 9 (10.1006/bbrc.1998.9435).
194. Boppart, M. D., Asp, S., Wojtaszewski, J. F., Fielding, R. A., Mohr, T., Goodyear, L. J., Marathon Running Transiently Increases C-Jun N^h2-Terminal Kinase and P38 Activities in Human Skeletal Muscle. *The Journal of physiology* **526 Pt 3**, 663-669 (2000); published online EpubAug 1 (
195. Boppart, M. D., Hirshman, M. F., Sakamoto, K., Fielding, R. A., Goodyear, L. J., Static Stretch Increases C-Jun N^h2-Terminal Kinase Activity and P38 Phosphorylation in Rat Skeletal Muscle. *American journal of physiology. Cell physiology* **280**, C352-358 (2001); published online EpubFeb (

196. Wretman, C., Lionikas, A., Widegren, U., Lannergren, J., Westerblad, H., Henriksson, J., Effects of Concentric and Eccentric Contractions on Phosphorylation of Mapk(Erk1/2) and Mapk(P38) in Isolated Rat Skeletal Muscle. *The Journal of physiology* **535**, 155-164 (2001); published online EpubAug 15 (
197. Yu, M., Blomstrand, E., Chibalin, A. V., Krook, A., Zierath, J. R., Marathon Running Increases Erk1/2 and P38 Map Kinase Signalling to Downstream Targets in Human Skeletal Muscle. *The Journal of physiology* **536**, 273-282 (2001); published online EpubOct 1 (
198. Pogozelski, A. R., Geng, T., Li, P., Yin, X., Lira, V. A., Zhang, M., Chi, J. T., Yan, Z., P38gamma Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Key Regulator in Skeletal Muscle Metabolic Adaptation in Mice. *PloS one* **4**, e7934 (2009)10.1371/journal.pone.0007934).
199. Coffey, V. G., Shield, A., Canny, B. J., Carey, K. A., Cameron-Smith, D., Hawley, J. A., Interaction of Contractile Activity and Training History on Mrna Abundance in Skeletal Muscle from Trained Athletes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **290**, E849-855 (2006); published online EpubMay (10.1152/ajpendo.00299.2005).
200. Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A., Tarnopolsky, M. A., Analysis of Global Mrna Expression in Human Skeletal Muscle During Recovery from Endurance Exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1498-1500 (2005); published online EpubSep (10.1096/fj.04-3149fje).
201. Pilegaard, H., Saltin, B., Neufer, P. D., Exercise Induces Transient Transcriptional Activation of the Pgc-1alpha Gene in Human Skeletal Muscle. *The Journal of physiology* **546**, 851-858 (2003); published online EpubFeb 1 (
202. Louis, E., Raue, U., Yang, Y., Jemiolo, B., Trappe, S., Time Course of Proteolytic, Cytokine, and Myostatin Gene Expression after Acute Exercise in Human Skeletal Muscle. *Journal of applied physiology* **103**, 1744-1751 (2007); published online EpubNov (10.1152/jappphysiol.00679.2007).
203. Raney, M. A., Turcotte, L. P., Regulation of Contraction-Induced Fa Uptake and Oxidation by Ampk and Erk1/2 Is Intensity Dependent in Rodent Muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **291**, E1220-1227 (2006); published online EpubDec (10.1152/ajpendo.00155.2006).

204. Turcotte, L. P., Raney, M. A., Todd, M. K., Erk1/2 Inhibition Prevents Contraction-Induced Increase in Plasma Membrane Fat/Cd36 Content and Fa Uptake in Rodent Muscle. *Acta physiologica Scandinavica* **184**, 131-139 (2005); published online EpubJun (10.1111/j.1365-201X.2005.01445.x).
205. Somwar, R., Koterski, S., Sweeney, G., Sciotti, R., Djuric, S., Berg, C., Trevillyan, J., Scherer, P. E., Rondinone, C. M., Klip, A., A Dominant-Negative P38 Mapk Mutant and Novel Selective Inhibitors of P38 Mapk Reduce Insulin-Stimulated Glucose Uptake in 3t3-L1 Adipocytes without Affecting Glut4 Translocation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 50386-50395 (2002); published online EpubDec 27 (10.1074/jbc.M205277200).
206. Simon, P., Fehrenbach, E., Niess, A. M., Regulation of Immediate Early Gene Expression by Exercise: Short Cuts for the Adaptation of Immune Function. *Exercise immunology review* **12**, 112-131 (2006).
207. Sheng, M., Greenberg, M. E., The Regulation and Function of C-Fos and Other Immediate Early Genes in the Nervous System. *Neuron* **4**, 477-485 (1990); published online EpubApr (
208. Greenberg, M. E., Ziff, E. B., Stimulation of 3t3 Cells Induces Transcription of the C-Fos Proto-Oncogene. *Nature* **311**, 433-438 (1984); published online EpubOct 4-10 (
209. Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., Leder, P., Cell-Specific Regulation of the C-Myc Gene by Lymphocyte Mitogens and Platelet-Derived Growth Factor. *Cell* **35**, 603-610 (1983); published online EpubDec (
210. Datta, R., Taneja, N., Sukhatme, V. P., Qureshi, S. A., Weichselbaum, R., Kufe, D. W., Reactive Oxygen Intermediates Target Cc(a/T)6gg Sequences to Mediate Activation of the Early Growth Response 1 Transcription Factor Gene by Ionizing Radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2419-2422 (1993); published online EpubMar 15 (
211. Puntschart, A., Wey, E., Jostarndt, K., Vogt, M., Wittwer, M., Widmer, H. R., Hoppeler, H., Billeter, R., Expression of Fos and Jun Genes in Human Skeletal Muscle after Exercise. *The American journal of physiology* **274**, C129-137 (1998); published online EpubJan (
212. Tamura, R. E., de Vasconcellos, J. F., Sarkar, D., Libermann, T. A., Fisher, P. B., Zerbini, L. F., Gadd45 Proteins: Central Players in Tumorigenesis. *Current molecular medicine* **12**, 634-651 (2012); published online EpubJun (

213. Leppa, S., Bohmann, D., Diverse Functions of Jnk Signaling and C-Jun in Stress Response and Apoptosis. *Oncogene* **18**, 6158-6162 (1999); published online EpubNov 1 (10.1038/sj.onc.1203173).
214. Preston, G. A., Lyon, T. T., Yin, Y., Lang, J. E., Solomon, G., Annab, L., Srinivasan, D. G., Alcorta, D. A., Barrett, J. C., Induction of Apoptosis by C-Fos Protein. *Molecular and cellular biology* **16**, 211-218 (1996); published online EpubJan (
215. Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L., Yaniv, M., Induction of Apoptosis by the Transcription Factor C-Jun. *The EMBO journal* **16**, 1695-1709 (1997); published online EpubApr 1 (10.1093/emboj/16.7.1695).
216. Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonhaler, H. B., Kenner, L., Tschachler, E., Wagner, E. F., Activator Protein 1 (Fos/Jun) Functions in Inflammatory Bone and Skin Disease. *Arthritis research & therapy* **10**, 201 (2008)10.1186/ar2338).
217. Shaulian, E., Karin, M., Ap-1 in Cell Proliferation and Survival. *Oncogene* **20**, 2390-2400 (2001); published online EpubApr 30 (10.1038/sj.onc.1204383).
218. Yokoyama, K., Hiyama, A., Arai, F., Nukaga, T., Sakai, D., Mochida, J., C-Fos Regulation by the Mapk and Pkc Pathways in Intervertebral Disc Cells. *PloS one* **8**, e73210 (2013)10.1371/journal.pone.0073210).
219. Sharrocks, A. D., The Ets-Domain Transcription Factor Family. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 827-837 (2001); published online EpubNov (10.1038/35099076).
220. Hipskind, R. A., Baccarini, M., Nordheim, A., Transient Activation of Raf-1, Mek, and Erk2 Coincides Kinetically with Ternary Complex Factor Phosphorylation and Immediate-Early Gene Promoter Activity in Vivo. *Molecular and cellular biology* **14**, 6219-6231 (1994); published online EpubSep (
221. Dalton, S., Treisman, R., Characterization of Sap-1, a Protein Recruited by Serum Response Factor to the C-Fos Serum Response Element. *Cell* **68**, 597-612 (1992); published online EpubFeb 7 (
222. Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., Nordheim, A., Activation of Ternary Complex Factor Elk-1 by Map Kinases. *The EMBO journal* **12**, 5097-5104 (1993); published online EpubDec 15 (
223. Graham, R., Gilman, M., Distinct Protein Targets for Signals Acting at the C-Fos Serum Response Element. *Science* **251**, 189-192 (1991); published online EpubJan 11 (

224. Treisman, R., Marais, R., Wynne, J., Spatial Flexibility in Ternary Complexes between Srf and Its Accessory Proteins. *The EMBO journal* **11**, 4631-4640 (1992); published online EpubDec (
225. Cruzalegui, F. H., Cano, E., Treisman, R., Erk Activation Induces Phosphorylation of Elk-1 at Multiple S/T-P Motifs to High Stoichiometry. *Oncogene* **18**, 7948-7957 (1999); published online EpubDec 23 (10.1038/sj.onc.1203362).
226. Zhang, H. M., Li, L., Papadopoulou, N., Hodgson, G., Evans, E., Galbraith, M., Dear, M., Vouquier, S., Saxton, J., Shaw, P. E., Mitogen-Induced Recruitment of Erk and Msk to Sre Promoter Complexes by Ternary Complex Factor Elk-1. *Nucleic acids research* **36**, 2594-2607 (2008); published online EpubMay (10.1093/nar/gkn099).
227. Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F. X., Karin, M., Induction of C-Fos Expression through Jnk-Mediated Tcf/Elk-1 Phosphorylation. *The EMBO journal* **14**, 5957-5964 (1995); published online EpubDec 1 (
228. Whitmarsh, A. J., Yang, S. H., Su, M. S., Sharrocks, A. D., Davis, R. J., Role of P38 and Jnk Mitogen-Activated Protein Kinases in the Activation of Ternary Complex Factors. *Molecular and cellular biology* **17**, 2360-2371 (1997); published online EpubMay (
229. Marais, R., Wynne, J., Treisman, R., The Srf Accessory Protein Elk-1 Contains a Growth Factor-Regulated Transcriptional Activation Domain. *Cell* **73**, 381-393 (1993); published online EpubApr 23 (
230. Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M. H., Shaw, P. E., Erk Phosphorylation Potentiates Elk-1-Mediated Ternary Complex Formation and Transactivation. *The EMBO journal* **14**, 951-962 (1995); published online EpubMar 1 (
231. Carrasco, M. A., Riveros, N., Rios, J., Muller, M., Torres, F., Pineda, J., Lantadilla, S., Jaimovich, E., Depolarization-Induced Slow Calcium Transients Activate Early Genes in Skeletal Muscle Cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **284**, C1438-1447 (2003); published online EpubJun (10.1152/ajpcell.00117.2002).
232. Michel, J. B., Ordway, G. A., Richardson, J. A., Williams, R. S., Biphasic Induction of Immediate Early Gene Expression Accompanies Activity-Dependent Angiogenesis and Myofiber Remodeling of Rabbit Skeletal Muscle. *The Journal of clinical investigation* **94**, 277-285 (1994); published online EpubJul (10.1172/JCI117318).
233. Goldspink, D. F., Cox, V. M., Smith, S. K., Eaves, L. A., Osbaldeston, N. J., Lee, D. M., Mantle, D., Muscle Growth in Response to Mechanical Stimuli. *The American journal of physiology* **268**, E288-297 (1995); published online EpubFeb (

234. Osbaldeston, N. J., Lee, D. M., Cox, V. M., Hesketh, J. E., Morrison, J. F., Blair, G. E., Goldspink, D. F., The Temporal and Cellular Expression of C-Fos and C-Jun in Mechanically Stimulated Rabbit Latissimus Dorsi Muscle. *The Biochemical journal* **308 (Pt 2)**, 465-471 (1995); published online EpubJun 1 (
235. Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M., Fujitsuka, N., Induction of Nuclear Respiratory Factor-1 Expression by an Acute Bout of Exercise in Rat Muscle. *Biochimica et biophysica acta* **1381**, 113-122 (1998); published online EpubJun 5 (
236. Nikolaidis, M. G., Papazisis, K. T., Kortsaris, A. H., Mougios, V., Exercise-Induced Changes in C-Fos Protein Levels in Skeletal Muscle of Trained and Untrained Rats. *International journal of sports medicine* **24**, 96-100 (2003); published online EpubFeb (10.1055/s-2003-38198).
237. Hood, D. A., Invited Review: Contractile Activity-Induced Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle. *Journal of applied physiology* **90**, 1137-1157 (2001); published online EpubMar (
238. Sandri, M., Carraro, U., Podhorska-Okolov, M., Rizzi, C., Arslan, P., Monti, D., Franceschi, C., Apoptosis, DNA Damage and Ubiquitin Expression in Normal and Mdx Muscle Fibers after Exercise. *FEBS letters* **373**, 291-295 (1995); published online EpubOct 16 (
239. Kami, K., Noguchi, K., Senba, E., Localization of Myogenin, C-Fos, C-Jun, and Muscle-Specific Gene Mrnas in Regenerating Rat Skeletal Muscle. *Cell and tissue research* **280**, 11-19 (1995); published online EpubApr (
240. Pedersen, B. K., Febbraio, M. A., Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiological reviews* **88**, 1379-1406 (2008); published online EpubOct (10.1152/physrev.90100.2007).
241. Pedersen, B. K., Febbraio, M. A., Muscles, Exercise and Obesity: Skeletal Muscle as a Secretory Organ. *Nature reviews. Endocrinology* **8**, 457-465 (2012); published online EpubAug (10.1038/nrendo.2012.49).
242. Scheler, M., Irmeler, M., Lehr, S., Hartwig, S., Staiger, H., Al-Hasani, H., Beckers, J., de Angelis, M. H., Haring, H. U., Weigert, C., Cytokine Response of Primary Human Myotubes in an in Vitro Exercise Model. *American journal of physiology. Cell physiology* **305**, C877-886 (2013); published online EpubOct 15 (10.1152/ajpcell.00043.2013).
243. Della Gatta, P. A., Cameron-Smith, D., Peake, J. M., Acute Resistance Exercise Increases the Expression of Chemotactic Factors within Skeletal Muscle. *European journal of*

- applied physiology* 10.1007/s00421-014-2936-4, (2014); published online EpubJun 27 (10.1007/s00421-014-2936-4).
244. Peterson, J. M., Pizza, F. X., Cytokines Derived from Cultured Skeletal Muscle Cells after Mechanical Strain Promote Neutrophil Chemotaxis in Vitro. *Journal of applied physiology* **106**, 130-137 (2009); published online EpubJan (10.1152/jappphysiol.90584.2008).
245. Pedersen, L., Hojman, P., Muscle-to-Organ Cross Talk Mediated by Myokines. *Adipocyte* **1**, 164-167 (2012); published online EpubJul 1 (10.4161/adip.20344).
246. Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., Klarlund Pedersen, B., Production of Interleukin-6 in Contracting Human Skeletal Muscles Can Account for the Exercise-Induced Increase in Plasma Interleukin-6. *The Journal of physiology* **529 Pt 1**, 237-242 (2000); published online EpubNov 15 (
247. Rubio, N., Sanz-Rodriguez, F., Induction of the Cxcl1 (Kc) Chemokine in Mouse Astrocytes by Infection with the Murine Encephalomyelitis Virus of Theiler. *Virology* **358**, 98-108 (2007); published online EpubFeb 5 (10.1016/j.virol.2006.08.003).
248. Stefan, N., Haring, H. U., The Role of Hepatokines in Metabolism. *Nature reviews. Endocrinology* **9**, 144-152 (2013); published online EpubMar (10.1038/nrendo.2012.258).
249. Febbraio, M. A., Pedersen, B. K., Muscle-Derived Interleukin-6: Mechanisms for Activation and Possible Biological Roles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1335-1347 (2002); published online EpubSep (10.1096/fj.01-0876rev).
250. Pedersen, B. K., Steensberg, A., Schjerling, P., Muscle-Derived Interleukin-6: Possible Biological Effects. *The Journal of physiology* **536**, 329-337 (2001); published online EpubOct 15 (
251. Keller, C., Steensberg, A., Pilegaard, H., Osada, T., Saltin, B., Pedersen, B. K., Neufer, P. D., Transcriptional Activation of the Il-6 Gene in Human Contracting Skeletal Muscle: Influence of Muscle Glycogen Content. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**, 2748-2750 (2001); published online EpubDec (10.1096/fj.01-0507fje).
252. Akerstrom, T., Steensberg, A., Keller, P., Keller, C., Penkowa, M., Pedersen, B. K., Exercise Induces Interleukin-8 Expression in Human Skeletal Muscle. *The Journal of physiology* **563**, 507-516 (2005); published online EpubMar 1 (10.1113/jphysiol.2004.077610).

253. Chan, M. H., Carey, A. L., Watt, M. J., Febbraio, M. A., Cytokine Gene Expression in Human Skeletal Muscle During Concentric Contraction: Evidence That Il-8, Like Il-6, Is Influenced by Glycogen Availability. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **287**, R322-327 (2004); published online EpubAug (10.1152/ajpregu.00030.2004).
254. Nieman, D. C., Davis, J. M., Henson, D. A., Walberg-Rankin, J., Shute, M., Dumke, C. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Carson, J. A., Brown, A., Lee, W. J., McAnulty, S. R., McAnulty, L. S., Carbohydrate Ingestion Influences Skeletal Muscle Cytokine Mrna and Plasma Cytokine Levels after a 3-H Run. *Journal of applied physiology* **94**, 1917-1925 (2003); published online EpubMay (10.1152/jappphysiol.01130.2002).
255. Frydelund-Larsen, L., Penkowa, M., Akerstrom, T., Zankari, A., Nielsen, S., Pedersen, B. K., Exercise Induces Interleukin-8 Receptor (Cxcr2) Expression in Human Skeletal Muscle. *Experimental physiology* **92**, 233-240 (2007); published online EpubJan (10.1113/expphysiol.2006.034769).
256. Pedersen, L., Pilegaard, H., Hansen, J., Brandt, C., Adser, H., Hidalgo, J., Olesen, J., Pedersen, B. K., Hojman, P., Exercise-Induced Liver Chemokine Cxcl-1 Expression Is Linked to Muscle-Derived Interleukin-6 Expression. *The Journal of physiology* **589**, 1409-1420 (2011); published online EpubMar 15 (10.1113/jphysiol.2010.200733).
257. Pedersen, L., Olsen, C. H., Pedersen, B. K., Hojman, P., Muscle-Derived Expression of the Chemokine Cxcl1 Attenuates Diet-Induced Obesity and Improves Fatty Acid Oxidation in the Muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **302**, E831-840 (2012); published online EpubApr 1 (10.1152/ajpendo.00339.2011).
258. Harri, M., Lindblom, J., Malinen, H., Hyttinen, M., Lapvetelainen, T., Eskola, S., Helminen, H. J., Effect of Access to a Running Wheel on Behavior of C57bl/6j Mice. *Laboratory animal science* **49**, 401-405 (1999); published online EpubAug (
259. Chaudhry, K., Rogers, R., Guo, M., Lai, Q., Goel, G., Liebelt, B., Ji, X., Curry, A., Carranza, A., Jimenez, D. F., Ding, Y., Matrix Metalloproteinase-9 (Mmp-9) Expression and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 (Erk1/2) Activation in Exercise-Reduced Neuronal Apoptosis after Stroke. *Neuroscience letters* **474**, 109-114 (2010); published online EpubApr 26 (10.1016/j.neulet.2010.03.020).
260. Clemons, A. P., Holstein, D. M., Galli, A., Saunders, C., Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in the Rat Is Significantly Ameliorated by Treatment with Mek1/2

- Inhibitors U0126 and Pd98059. *Pancreas* **25**, 251-259 (2002); published online EpubOct (
261. Flores, L. G., Bertolini, S., Yeh, H. H., Young, D., Mukhopadhyay, U., Pal, A., Ying, Y., Volgin, A., Shavrin, A., Soghomonyan, S., Tong, W., Bornmann, W., Alauddin, M. M., Logsdon, C., Gelovani, J. G., Detection of Pancreatic Carcinomas by Imaging Lactose-Binding Protein Expression in Peritumoral Pancreas Using [18f]Fluoroethyl-Deoxylactose Pet/Ct. *PloS one* **4**, e7977 (2009)10.1371/journal.pone.0007977).
262. Jo, S. K., Cho, W. Y., Sung, S. A., Kim, H. K., Won, N. H., Mek Inhibitor, U0126, Attenuates Cisplatin-Induced Renal Injury by Decreasing Inflammation and Apoptosis. *Kidney international* **67**, 458-466 (2005); published online EpubFeb (10.1111/j.1523-1755.2005.67102.x).
263. Liebelt, B., Papapetrou, P., Ali, A., Guo, M., Ji, X., Peng, C., Rogers, R., Curry, A., Jimenez, D., Ding, Y., Exercise Preconditioning Reduces Neuronal Apoptosis in Stroke by up-Regulating Heat Shock Protein-70 (Heat Shock Protein-72) and Extracellular-Signal-Regulated-Kinase 1/2. *Neuroscience* **166**, 1091-1100 (2010); published online EpubApr 14 (10.1016/j.neuroscience.2009.12.067).
264. Maddahi, A., Edvinsson, L., Cerebral Ischemia Induces Microvascular Pro-Inflammatory Cytokine Expression Via the Mek/Erk Pathway. *Journal of neuroinflammation* **7**, 14 (2010)10.1186/1742-2094-7-14).
265. Wang, L. C., Kernell, D., Fibre Type Regionalisation in Lower Hindlimb Muscles of Rabbit, Rat and Mouse: A Comparative Study. *Journal of anatomy* **199**, 631-643 (2001); published online EpubDec (
266. Chan, T. M., Exton, J. H., A Rapid Method for the Determination of Glycogen Content and Radioactivity in Small Quantities of Tissue or Isolated Hepatocytes. *Analytical biochemistry* **71**, 96-105 (1976); published online EpubMar (
267. Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., Trzaskos, J. M., Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 18623-18632 (1998); published online EpubJul 17 (
268. Vanhoutte, P., Barnier, J. V., Guibert, B., Pages, C., Besson, M. J., Hipskind, R. A., Caboche, J., Glutamate Induces Phosphorylation of Elk-1 and Creb, Along with C-Fos Activation, Via an Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Pathway in Brain Slices. *Molecular and cellular biology* **19**, 136-146 (1999); published online EpubJan (

269. DeSilva, D. R., Jones, E. A., Favata, M. F., Jaffee, B. D., Magolda, R. L., Trzaskos, J. M., Scherle, P. A., Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Blocks T Cell Proliferation but Does Not Induce or Prevent Energy. *Journal of immunology* **160**, 4175-4181 (1998); published online EpubMay 1 (
270. Safdar, A., Little, J. P., Stokl, A. J., Hettinga, B. P., Akhtar, M., Tarnopolsky, M. A., Exercise Increases Mitochondrial Pgc-1alpha Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-Talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10605-10617 (2011); published online EpubMar 25 (10.1074/jbc.M110.211466).
271. Neuffer, P. D., Dohm, G. L., Exercise Induces a Transient Increase in Transcription of the Glut-4 Gene in Skeletal Muscle. *The American journal of physiology* **265**, C1597-1603 (1993); published online EpubDec (
272. Dokladda, K., Green, K. A., Pan, D. A., Hardie, D. G., Pd98059 and U0126 Activate Amp-Activated Protein Kinase by Increasing the Cellular Amp:Atp Ratio and Not Via Inhibition of the Map Kinase Pathway. *FEBS letters* **579**, 236-240 (2005); published online EpubJan 3 (10.1016/j.febslet.2004.11.084).
273. Delghandi, M. P., Johannessen, M., Moens, U., The Camp Signalling Pathway Activates Creb through Pka, P38 and Msk1 in Nih 3t3 Cells. *Cellular signalling* **17**, 1343-1351 (2005); published online EpubNov (10.1016/j.cellsig.2005.02.003).
274. Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., Maratos-Flier, E., Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by Pparalpha and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell metabolism* **5**, 426-437 (2007); published online EpubJun (10.1016/j.cmet.2007.05.002).
275. Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J. K., Gerard, R. D., Burgess, S. C., Hammer, R. E., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A., Endocrine Regulation of the Fasting Response by Pparalpha-Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell metabolism* **5**, 415-425 (2007); published online EpubJun (10.1016/j.cmet.2007.05.003).
276. Lundasen, T., Hunt, M. C., Nilsson, L. M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S. E., Rudling, M., Pparalpha Is a Key Regulator of Hepatic Fgf21. *Biochemical and biophysical research communications* **360**, 437-440 (2007); published online EpubAug 24 (10.1016/j.bbrc.2007.06.068).
277. Browning, J. D., Weis, B., Davis, J., Satapati, S., Merritt, M., Malloy, C. R., Burgess, S. C., Alterations in Hepatic Glucose and Energy Metabolism as a Result of Calorie and

- Carbohydrate Restriction. *Hepatology* **48**, 1487-1496 (2008); published online EpubNov (10.1002/hep.22504).
278. Chen, X., Iqbal, N., Boden, G., The Effects of Free Fatty Acids on Gluconeogenesis and Glycogenolysis in Normal Subjects. *The Journal of clinical investigation* **103**, 365-372 (1999); published online EpubFeb (10.1172/JCI5479).
279. Staehr, P., Hother-Nielsen, O., Landau, B. R., Chandramouli, V., Holst, J. J., Beck-Nielsen, H., Effects of Free Fatty Acids Per Se on Glucose Production, Gluconeogenesis, and Glycogenolysis. *Diabetes* **52**, 260-267 (2003); published online EpubFeb (
280. Julius, U., Influence of Plasma Free Fatty Acids on Lipoprotein Synthesis and Diabetic Dyslipidemia. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **111**, 246-250 (2003); published online EpubAug (10.1055/s-2003-41284).
281. Coppack, S. W., Jensen, M. D., Miles, J. M., In Vivo Regulation of Lipolysis in Humans. *Journal of lipid research* **35**, 177-193 (1994); published online EpubFeb (
282. Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C., Lemieux, S., Effects of Acute Changes of Plasma Free Fatty Acids on Intramyocellular Fat Content and Insulin Resistance in Healthy Subjects. *Diabetes* **50**, 1612-1617 (2001); published online EpubJul (
283. Kowalski, G. M., Bruce, C. R., The Regulation of Glucose Metabolism: Implications and Considerations for the Assessment of Glucose Homeostasis in Rodents. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **307**, E859-E871 (2014); published online EpubNov 15 (10.1152/ajpendo.00165.2014).
284. Ayala, J. E., Bracy, D. P., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., Considerations in the Design of Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamps in the Conscious Mouse. *Diabetes* **55**, 390-397 (2006); published online EpubFeb (
285. Irimia, J. M., Meyer, C. M., Peper, C. L., Zhai, L., Bock, C. B., Previs, S. F., McGuinness, O. P., DePaoli-Roach, A., Roach, P. J., Impaired Glucose Tolerance and Predisposition to the Fasted State in Liver Glycogen Synthase Knock-out Mice. *The Journal of biological chemistry* **285**, 12851-12861 (2010); published online EpubApr 23 (10.1074/jbc.M110.106534).
286. Neuffer, P. D., Ordway, G. A., Williams, R. S., Transient Regulation of C-Fos, Alpha B-Crystallin, and Hsp70 in Muscle During Recovery from Contractile Activity. *The American journal of physiology* **274**, C341-346 (1998); published online EpubFeb (

287. Pilegaard, H., Ordway, G. A., Saltin, B., Neufer, P. D., Transcriptional Regulation of Gene Expression in Human Skeletal Muscle During Recovery from Exercise. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **279**, E806-814 (2000); published online EpubOct (
288. Baar, K., Blough, E., Dineen, B., Esser, K., Transcriptional Regulation in Response to Exercise. *Exercise and sport sciences reviews* **27**, 333-379 (1999).
289. Bishopric, N. H., Jayasena, V., Webster, K. A., Positive Regulation of the Skeletal Alpha-Actin Gene by Fos and Jun in Cardiac Myocytes. *The Journal of biological chemistry* **267**, 25535-25540 (1992); published online EpubDec 15 (
290. Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Ookawara, T., Ohno, H., Ji, L. L., Superoxide Dismutase Gene Expression Is Activated by a Single Bout of Exercise in Rat Skeletal Muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **442**, 426-434 (2001); published online EpubJun (
291. Iwaki, K., Sukhatme, V. P., Shubeita, H. E., Chien, K. R., Alpha- and Beta-Adrenergic Stimulation Induces Distinct Patterns of Immediate Early Gene Expression in Neonatal Rat Myocardial Cells. Fos/Jun Expression Is Associated with Sarcomere Assembly; Egr-1 Induction Is Primarily an Alpha 1-Mediated Response. *The Journal of biological chemistry* **265**, 13809-13817 (1990); published online EpubAug 15 (
292. Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, H. A., Kohno, K., Kuwano, M., Induction of Vascular Endothelial Growth Factor by Tumor Necrosis Factor Alpha in Human Glioma Cells. Possible Roles of Sp-1. *The Journal of biological chemistry* **271**, 28220-28228 (1996); published online EpubNov 8 (
293. Short, M. L., Huang, D., Milkowski, D. M., Short, S., Kunstman, K., Soong, C. J., Chung, K. C., Jungmann, R. A., Analysis of the Rat Lactate Dehydrogenase a Subunit Gene Promoter/Regulatory Region. *The Biochemical journal* **304** (Pt 2), 391-398 (1994); published online EpubDec 1 (
294. Guezennec, C. Y., Gilson, E., Serrurier, B., Comparative Effects of Hindlimb Suspension and Exercise on Skeletal Muscle Myosin Isozymes in Rats. *European journal of applied physiology and occupational physiology* **60**, 430-435 (1990).
295. Gustafsson, T., Bodin, K., Sylven, C., Gordon, A., Tyni-Lenne, R., Jansson, E., Increased Expression of Vegf Following Exercise Training in Patients with Heart Failure. *European journal of clinical investigation* **31**, 362-366 (2001); published online EpubApr (

296. Morrison, P. R., Biggs, R. B., Booth, F. W., Daily Running for 2 Wk and Mrnas for Cytochrome C and Alpha-Actin in Rat Skeletal Muscle. *The American journal of physiology* **257**, C936-939 (1989); published online EpubNov (
297. Rodas, G., Ventura, J. L., Cadefau, J. A., Cusso, R., Parra, J., A Short Training Programme for the Rapid Improvement of Both Aerobic and Anaerobic Metabolism. *European journal of applied physiology* **82**, 480-486 (2000); published online EpubAug (10.1007/s004210000223).
298. Panda, S., Hogenesch, J. B., Kay, S. A., Circadian Rhythms from Flies to Human. *Nature* **417**, 329-335 (2002); published online EpubMay 16 (10.1038/417329a).
299. Reppert, S. M., Weaver, D. R., Coordination of Circadian Timing in Mammals. *Nature* **418**, 935-941 (2002); published online EpubAug 29 (10.1038/nature00965).
300. Bass, J., Takahashi, J. S., Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science* **330**, 1349-1354 (2010); published online EpubDec 3 (10.1126/science.1195027).
301. Froy, O., Metabolism and Circadian Rhythms--Implications for Obesity. *Endocrine reviews* **31**, 1-24 (2010); published online EpubFeb (10.1210/er.2009-0014).
302. Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H., Turek, F. W., Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. *Obesity* **17**, 2100-2102 (2009); published online EpubNov (10.1038/oby.2009.264).
303. Satoh, Y., Kawai, H., Kudo, N., Kawashima, Y., Mitsumoto, A., Time-Restricted Feeding Entrain Daily Rhythms of Energy Metabolism in Mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **290**, R1276-1283 (2006); published online EpubMay (10.1152/ajpregu.00775.2005).
304. Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., Hogenesch, J. B., Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* **109**, 307-320 (2002); published online EpubMay 3 (
305. Namura, S., Iihara, K., Takami, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Matsushita, K., Moskowitz, M. A., Bonventre, J. V., Alessandrini, A., Intravenous Administration of Mek Inhibitor U0126 Affords Brain Protection against Forebrain Ischemia and Focal Cerebral Ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11569-11574 (2001); published online EpubSep 25 (10.1073/pnas.181213498).
306. Mauro, A., Ciccarelli, C., De Cesaris, P., Scoglio, A., Bouche, M., Molinaro, M., Aquino, A., Zani, B. M., Pkcalpha-Mediated Erk, Jnk and P38 Activation Regulates the

- Myogenic Program in Human Rhabdomyosarcoma Cells. *Journal of cell science* **115**, 3587-3599 (2002); published online EpubSep 15 (
307. Benson, J. D., Chen, Y. N., Cornell-Kennon, S. A., Dorsch, M., Kim, S., Leszczyniecka, M., Sellers, W. R., Lengauer, C., Validating Cancer Drug Targets. *Nature* **441**, 451-456 (2006); published online EpubMay 25 (10.1038/nature04873).
308. Roberts, P. J., Der, C. J., Targeting the Raf-Mek-Erk Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for the Treatment of Cancer. *Oncogene* **26**, 3291-3310 (2007); published online EpubMay 14 (10.1038/sj.onc.1210422).
309. Flores, L. G., 2nd, Yeh, H. H., Soghomonyan, S., Young, D., Bankson, J., Hu, Q., Alauddin, M., Huff, V., Gelovani, J. G., Monitoring Therapy with Mek Inhibitor U0126 in a Novel Wilms Tumor Model in Wt1 Knockout Igf2 Transgenic Mice Using 18f-Fdg Pet with Dual-Contrast Enhanced Ct and Mri: Early Metabolic Response without Inhibition of Tumor Growth. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* **15**, 175-185 (2013); published online EpubApr (10.1007/s11307-012-0588-5).
310. Yip-Schneider, M. T., Schmidt, C. M., Mek Inhibition of Pancreatic Carcinoma Cells by U0126 and Its Effect in Combination with Sulindac. *Pancreas* **27**, 337-344 (2003); published online EpubNov (
311. Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R. C., Tecle, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W. R., Saltiel, A. R., Blockade of the Map Kinase Pathway Suppresses Growth of Colon Tumors in Vivo. *Nature medicine* **5**, 810-816 (1999); published online EpubJul (10.1038/10533).
312. Manning, A. M., Davis, R. J., Targeting Jnk for Therapeutic Benefit: From Junk to Gold? *Nature reviews. Drug discovery* **2**, 554-565 (2003); published online EpubJul (10.1038/nrd1132).
313. Must, A., Spadano, J., Coakley, E. H., Field, A. E., Colditz, G., Dietz, W. H., The Disease Burden Associated with Overweight and Obesity. *Jama* **282**, 1523-1529 (1999); published online EpubOct 27 (
314. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G. S., A Central Role for Jnk in Obesity and Insulin Resistance. *Nature* **420**, 333-336 (2002); published online EpubNov 21 (10.1038/nature01137).
315. Hwang, S. L., Jeong, Y. T., Li, X., Kim, Y. D., Lu, Y., Chang, Y. C., Lee, I. K., Chang, H. W., Inhibitory Cross-Talk between the Ampk and Erk Pathways Mediates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *British*

- journal of pharmacology* **169**, 69-81 (2013); published online EpubMay (10.1111/bph.12124).
316. Aw, D. K., Sinha, R. A., Xie, S. Y., Yen, P. M., Differential Ampk Phosphorylation by Glucagon and Metformin Regulates Insulin Signaling in Human Hepatic Cells. *Biochemical and biophysical research communications* **447**, 569-573 (2014); published online EpubMay 16 (10.1016/j.bbrc.2014.04.031).
317. Winder, W. W., Beattie, M. A., Fuller, E. O., Glycogenolytic Rates and Camp in Livers of Rats Running at Different Treadmill Speeds. *The American journal of physiology* **245**, R353-356 (1983); published online EpubSep (
318. Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J., Sturgill, T. W., Inhibition of the Egf-Activated Map Kinase Signaling Pathway by Adenosine 3',5'-Monophosphate. *Science* **262**, 1065-1069 (1993); published online EpubNov 12 (
319. Cook, S. J., McCormick, F., Inhibition by Camp of Ras-Dependent Activation of Raf. *Science* **262**, 1069-1072 (1993); published online EpubNov 12 (
320. Severson, B. R., Kong, X., Lawrence, J. C., Jr., Increasing Camp Attenuates Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10305-10309 (1993); published online EpubNov 1 (
321. Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Raines, E. W., Potts, B. C., Macdonald, S. G., Ross, R., Krebs, E. G., Protein Kinase a Antagonizes Platelet-Derived Growth Factor-Induced Signaling by Mitogen-Activated Protein Kinase in Human Arterial Smooth Muscle Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10300-10304 (1993); published online EpubNov 1 (
322. Winder, W. W., Role of Cyclic Amp in Regulation of Hepatic Glucose Production During Exercise. *Medicine and science in sports and exercise* **20**, 551-559 (1988); published online EpubDec (
323. Ruderman, N. B., Park, H., Kaushik, V. K., Dean, D., Constant, S., Prentki, M., Saha, A. K., Ampk as a Metabolic Switch in Rat Muscle, Liver and Adipose Tissue after Exercise. *Acta physiologica Scandinavica* **178**, 435-442 (2003); published online EpubAug (10.1046/j.1365-201X.2003.01164.x).
324. Kelly, M., Keller, C., Avilucea, P. R., Keller, P., Luo, Z., Xiang, X., Giralt, M., Hidalgo, J., Saha, A. K., Pedersen, B. K., Ruderman, N. B., Ampk Activity Is Diminished in Tissues of Il-6 Knockout Mice: The Effect of Exercise. *Biochemical and biophysical*

- research communications* **320**, 449-454 (2004); published online EpubJul 23 (10.1016/j.bbrc.2004.05.188).
325. Whitham, M., Chan, M. H., Pal, M., Matthews, V. B., Prelovsek, O., Lunke, S., El-Osta, A., Broenneke, H., Alber, J., Bruning, J. C., Wunderlich, F. T., Lancaster, G. I., Febbraio, M. A., Contraction-Induced Interleukin-6 Gene Transcription in Skeletal Muscle Is Regulated by C-Jun Terminal Kinase/Activator Protein-1. *The Journal of biological chemistry* **287**, 10771-10779 (2012); published online EpubMar 30 (10.1074/jbc.M111.310581).
326. Tarantino, G., Caputi, A., Jnks, Insulin Resistance and Inflammation: A Possible Link between Nafld and Coronary Artery Disease. *World journal of gastroenterology : WJG* **17**, 3785-3794 (2011); published online EpubSep 7 (10.3748/wjg.v17.i33.3785).
327. Lee, Y. H., Giraud, J., Davis, R. J., White, M. F., C-Jun N-Terminal Kinase (Jnk) Mediates Feedback Inhibition of the Insulin Signaling Cascade. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2896-2902 (2003); published online EpubJan 31 (10.1074/jbc.M208359200).
328. Berdichevsky, A., Guarente, L., Bose, A., Acute Oxidative Stress Can Reverse Insulin Resistance by Inactivation of Cytoplasmic Jnk. *The Journal of biological chemistry* **285**, 21581-21589 (2010); published online EpubJul 9 (10.1074/jbc.M109.093633).
329. Fey, D., Croucher, D. R., Kolch, W., Kholodenko, B. N., Crosstalk and Signaling Switches in Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades. *Frontiers in physiology* **3**, 355 (2012)10.3389/fphys.2012.00355).
330. Fleming, Y., Armstrong, C. G., Morrice, N., Paterson, A., Goedert, M., Cohen, P., Synergistic Activation of Stress-Activated Protein Kinase 1/C-Jun N-Terminal Kinase (Sapk1/Jnk) Isoforms by Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 (Mkk4) and Mkk7. *The Biochemical journal* **352 Pt 1**, 145-154 (2000); published online EpubNov 15 (
331. Wada, T., Nakagawa, K., Watanabe, T., Nishitai, G., Seo, J., Kishimoto, H., Kitagawa, D., Sasaki, T., Penninger, J. M., Nishina, H., Katada, T., Impaired Synergistic Activation of Stress-Activated Protein Kinase Sapk/Jnk in Mouse Embryonic Stem Cells Lacking Sek1/Mkk4: Different Contribution of Sek2/Mkk7 Isoforms to the Synergistic Activation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 30892-30897 (2001); published online EpubAug 17 (10.1074/jbc.M011780200).
332. Kishimoto, H., Nakagawa, K., Watanabe, T., Kitagawa, D., Momose, H., Seo, J., Nishitai, G., Shimizu, N., Ohata, S., Tanemura, S., Asaka, S., Goto, T., Fukushi, H., Yoshida, H.,

- Suzuki, A., Sasaki, T., Wada, T., Penninger, J. M., Nishina, H., Katada, T., Different Properties of Sek1 and Mkk7 in Dual Phosphorylation of Stress-Induced Activated Protein Kinase Sapk/Jnk in Embryonic Stem Cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 16595-16601 (2003); published online EpubMay 9 (10.1074/jbc.M213182200).
333. Shin, S. Y., Rath, O., Choo, S. M., Fee, F., McFerran, B., Kolch, W., Cho, K. H., Positive- and Negative-Feedback Regulations Coordinate the Dynamic Behavior of the Ras-Raf-Mek-Erk Signal Transduction Pathway. *Journal of cell science* **122**, 425-435 (2009); published online EpubFeb 1 (10.1242/jcs.036319).
334. Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F., Chao, M. V., Akt Phosphorylates and Negatively Regulates Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *Molecular and cellular biology* **21**, 893-901 (2001); published online EpubFeb (10.1128/MCB.21.3.893-901.2001).
335. Barthwal, M. K., Sathyanarayana, P., Kundu, C. N., Rana, B., Pradeep, A., Sharma, C., Woodgett, J. R., Rana, A., Negative Regulation of Mixed Lineage Kinase 3 by Protein Kinase B/Akt Leads to Cell Survival. *The Journal of biological chemistry* **278**, 3897-3902 (2003); published online EpubFeb 7 (10.1074/jbc.M211598200).
336. Park, H. S., Kim, M. S., Huh, S. H., Park, J., Chung, J., Kang, S. S., Choi, E. J., Akt (Protein Kinase B) Negatively Regulates Sek1 by Means of Protein Phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 2573-2578 (2002); published online EpubJan 25 (10.1074/jbc.M110299200).
337. Pette, D., Vrbova, G., Adaptation of Mammalian Skeletal Muscle Fibers to Chronic Electrical Stimulation. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **120**, 115-202 (1992).
338. Salmons, S., Sreter, F. A., Significance of Impulse Activity in the Transformation of Skeletal Muscle Type. *Nature* **263**, 30-34 (1976); published online EpubSep 2 (
339. Williams, R. S., Salmons, S., Newsholme, E. A., Kaufman, R. E., Mellor, J., Regulation of Nuclear and Mitochondrial Gene Expression by Contractile Activity in Skeletal Muscle. *The Journal of biological chemistry* **261**, 376-380 (1986); published online EpubJan 5 (
340. Staron, R. S., Kraemer, W. J., Hikida, R. S., Fry, A. C., Murray, J. D., Campos, G. E., Fiber Type Composition of Four Hindlimb Muscles of Adult Fisher 344 Rats. *Histochemistry and cell biology* **111**, 117-123 (1999); published online EpubFeb (

341. Lexell, J., Jarvis, J. C., Currie, J., Downham, D. Y., Salmons, S., Fibre Type Composition of Rabbit Tibialis Anterior and Extensor Digitorum Longus Muscles. *Journal of anatomy* **185** (Pt 1), 95-101 (1994); published online EpubAug (
342. Plomgaard, P., Penkowa, M., Pedersen, B. K., Fiber Type Specific Expression of Tnf-Alpha, Il-6 and Il-18 in Human Skeletal Muscles. *Exercise immunology review* **11**, 53-63 (2005).
343. Lee-Young, R. S., Canny, B. J., Myers, D. E., McConell, G. K., Ampk Activation Is Fiber Type Specific in Human Skeletal Muscle: Effects of Exercise and Short-Term Exercise Training. *Journal of applied physiology* **107**, 283-289 (2009); published online EpubJul (10.1152/jappphysiol.91208.2008).
344. Daugaard, J. R., Nielsen, J. N., Kristiansen, S., Andersen, J. L., Hargreaves, M., Richter, E. A., Fiber Type-Specific Expression of Glut4 in Human Skeletal Muscle: Influence of Exercise Training. *Diabetes* **49**, 1092-1095 (2000); published online EpubJul (
345. Irintchev, A., Wernig, A., Muscle Damage and Repair in Voluntarily Running Mice: Strain and Muscle Differences. *Cell and tissue research* **249**, 509-521 (1987); published online EpubSep (
346. Wernig, A., Irintchev, A., Weisshaupt, P., Muscle Injury, Cross-Sectional Area and Fibre Type Distribution in Mouse Soleus after Intermittent Wheel-Running. *The Journal of physiology* **428**, 639-652 (1990); published online EpubSep (
347. Kim, K. H., Kim, S. H., Min, Y. K., Yang, H. M., Lee, J. B., Lee, M. S., Acute Exercise Induces Fgf21 Expression in Mice and in Healthy Humans. *PloS one* **8**, e63517 (2013)10.1371/journal.pone.0063517).
348. Cyphert, H. A., Alonge, K. M., Ippagunta, S. M., Hillgartner, F. B., Glucagon Stimulates Hepatic Fgf21 Secretion through a Pka- and Epac-Dependent Posttranscriptional Mechanism. *PloS one* **9**, e94996 (2014)10.1371/journal.pone.0094996).
349. Mashili, F. L., Austin, R. L., Deshmukh, A. S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J. R., Chibalin, A. V., Moller, D. E., Kharitonov, A., Krook, A., Direct Effects of Fgf21 on Glucose Uptake in Human Skeletal Muscle: Implications for Type 2 Diabetes and Obesity. *Diabetes/metabolism research and reviews* **27**, 286-297 (2011); published online EpubMar (10.1002/dmrr.1177).

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.1: Wie wirkt sich eine Hemmung der ERK1/2 MAPK auf die Ausdauersport-induzierte IEG und Cytokin Expression in Skelettmuskel und Leber aus?	29
Abbildung 5.1: Übersicht der Gruppenunterteilung bei Experiment Nahrungsrestriktion / Wiederfütterung.	41
Abbildung 5.2: Zeitplan der Experimentdurchführung.	42
Abbildung 5.3: Übersicht der Gruppenunterteilung in U0126 Experimenten.	43
Abbildung 5.4: Zeitplan der Experimentdurchführung.	44
Abbildung 5.5: Modell der EP-Stimulation und U0126 Inhibition in C2C12 Zellen.	51
Abbildung 6.1: Metabolische Parameter in Plasma und Leber nach Ausdauersport in gefasteten bzw. wiedergefütterten Mäusen.	65
Abbildung 6.2: Nahrungsrestriktion verursacht eine vollständige Depletion der Glykogenspeicher in der Leber.	65
Abbildung 6.3: <i>Igfbp1</i> , <i>G6pc</i> , <i>Ppargc1a</i> und <i>Pdk4</i> sind in der Leber nach Nahrungsrestriktion signifikant erhöht.	66
Abbildung 6.4: ERK1 ist in der Leber nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf aktiviert.	67
Abbildung 6.6: U0126 inhibiert ERK1 und JNK in Leber und Skelettmuskel.	73
Abbildung 6.7: Vergleich der IEG Expression nach U0126 Applikation in Leber und Skelettmuskel nach Ausdauersport.	74
Abbildung 6.9: Die Phosphorylierung von ELK-1 ist infolge einer Hemmung von ERK1/2 nur im Muskel erniedrigt.	79
Abbildung 6.10: <i>Ppargc1a</i> und <i>Cxcl1</i> sind im Muskel infolge einer Deaktivierung von ERK1/2 nach Ausdauersport und dreistündiger Erholungsphase signifikant erniedrigt.	80
Abbildung 6.11: U0126 inhibiert <i>in vitro</i> nicht die EPS-induzierte Genexpression von <i>Ppargc1a</i> und <i>Cxcl1</i> .	83
Abbildung 6.12: Die Phosphorylierung von ELK-1 ist nach einer 4-stündigen EP-Stimulation infolge der U0126 Applikation in C2C12 Zellen tendenziell erniedrigt.	84
Abbildung 6.14: Keine verminderte Genexpression von <i>Ppargc1a</i> und <i>Cxcl1</i> nach Inhibition der ERK1/2 Aktivität mit PD184352.	86
Abbildung 6.15: Ein Herunterregulation von ERK1/2 hat keinen Effekt auf die Expression von <i>Cxcl1</i> in C2C12 Zellen.	87
Abbildung 6.16: Eine Hemmung der JNK Aktivität führt zu einer erniedrigten EP-stimulierten <i>Cxcl1</i> Expression in C2C12 Zellen.	88
Abbildung 6.18: Die CREB-1 Phosphorylierung wird weder in der Leber noch im Skelettmuskel durch eine U0126 Applikation beeinflusst.	90
Abbildung 6.19: Ein 60-minütiger Ausdauerlauf bewirkt im Tibialis Muskel keine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK.	92

Abbildung 6.20: Eine 60-minütige Ausdauerbelastung allein verursacht einen Anstieg von FGF21 in Plasma und Leber.	94
Abbildung 6.21: Nach einer 60-minütigen Ausdauerbelastung ist <i>Fgf21</i> im Skelettmuskel nicht exprimiert.	95
Abbildung 7.1: Vergleich der Glykogenspiegel in der Leber nach Nahrungszufuhr mit oder ohne vorangegangener 16-stündiger Nahrungsrestriktion.	101
Abbildung 7.2: Hypothetische Beeinflussung der JNK MAPK durch den MEK Inhibitor U0126.	108
Abbildung 7.3: <i>Fos</i> und <i>Jun</i> Expression im Tibialis Muskel nach einem 60-minütigen Ausdauerlauf (Miriam Hoene Doktorarbeit, 2010)	110
Abbildung 7.4: Die JNK MAPK ist für die Ausdauersport-induzierte IEG, PGC1 α und CXCL1 Expression im Skelettmuskel verantwortlich.	112

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 4-1: Lysepuffer für Protein Isolation in Leber und Muskel	48
Tabelle 4-2: Komponenten der siRNA Transfektion.....	50
Tabelle 4-3: Verwendete Inhibitoren und eingesetzte Konzentrationen.	50
Tabelle 4-4: Lysepuffer	53
Tabelle 4-5: Phosphatase Inhibitoren	53
Tabelle 4-6: BSA Standard Konzentrationen	54
Tabelle 4-7: 5x Lämmli Puffer	55
Tabelle 4-8: Elektrophorese Puffer	56
Tabelle 4-9: Zusammensetzung Trenngel- und Sammelgelpuffer	56
Tabelle 4-10: Pipettierschema für Trenngel und Sammelgel	56
Tabelle 4-11: 10x Western Blot-Puffer	57
Tabelle 4-12: NET-G Blockpuffer (pH 7.4)	57
Tabelle 4-13: Lösung A für ECL.....	58
Tabelle 4-14: Lösung B für ECL.....	58
Tabelle 4-15: Stripping Puffer (pH 6.8).....	58
Tabelle 4-16: 1x Reaktionsmix für RT-PCR.....	61
Tabelle 4-17: RT-PCR Bedingungen.....	61
Tabelle 4-18: 1x Reaktionsmix für QuantiTect PCR.....	61
Tabelle 4-19: QuantiTect qRT-PCR Programm	62
Tabelle 5-1: Die Applikation von U0126 verursacht keine signifikanten Unterschiede in der metabolischen Antwort auf Ausdauersport..	77
Tabelle 5-2: Infolge einer Deaktivierung sind in der Leber nach Ausdauersport und dreistündiger Erholungsphase die Triglyzeride signifikant erhöht.	81

