

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Sektion für Neuroimmunologie

Leiter: Prof. Dr. med. Uwe Klaus Zettl

Und dem Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf

Abteilung Signaltransduktion

Leiter: PD Dr. rer. nat. Andreas Höflich

Transkriptomanalyse der Hypophyse zum besseren Verständnis des Energiestoffwechsels der auf hohe Laufleistung selektierten Mauslinie DUhLB

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Caroline Charlotte Caffier

Geboren am 12.06.1997 in Dresden

Rostock November 2021

Gutachter:

1. Prof. Dr. Uwe Klaus Zettl, Universität Rostock/ Klinik und Poliklinik für Neurologie
2. PD Dr. rer. nat. Andreas Höflich, Forschungsinstitut für Nutztierbiologie in Dummerstorf/
Institut für Genombiologie
3. Prof. Dr. Michael Lammers, Universität Greifswald/ Institut für Biochemie

Datum der Einreichung: 16.11.2021

Datum der Verteidigung: 23.08.2022

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Regulation des Stoffwechsels.....	7
1.1.1	Mangel an Bewegung als Einfluss auf die Ausbildung metabolischer Erkrankungen.....	7
1.1.2	Grundlagen des Energiestoffwechsels bei sportlicher Aktivität.....	8
1.1.3	Kommunikation der am Stoffwechsel beteiligten Organe.....	9
1.2	Hypophyse.....	10
1.2.1	Anatomie.....	10
1.2.2	Physiologie und Funktion	10
1.2.2.1	<i>Growth hormone</i>	11
1.2.2.2	Prolaktin	12
1.2.2.3	Adrenokortikotropes Hormon.....	12
1.2.2.4	Thyroidea-stimulierendes Hormon.....	13
1.2.2.5	Luteinisierendes Hormon und Follikel-stimulierendes Hormon	14
1.2.2.6	Oxytozin	14
1.2.2.7	Antidiuretisches Hormon	15
1.2.3	Einfluss der Hypophyse auf den Stoffwechsel unter körperlicher Aktivität	15
1.3	Untersuchung von Stoffwechselanpassungen anhand der Genexpression.....	16
1.3.1	Regulation der Genexpression	16
1.3.2	Messung der Genexpression auf Transkriptomebene.....	17
1.4	Untersuchung von Stoffwechselanpassungen unter körperlicher Aktivität anhand von Mausmodellen.....	18
1.4.1	Dummerstorfer Langzeitselektionslinie für hohe Laufbandleistung DUhLB.....	19
1.4.2	Bekannte Anpassungen im Stoffwechsel von DUhLB-Mäusen	20
2	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Material.....	25
3.1.1	Primer zur Messung der Genexpression in der qRT-PCR	25
3.1.2	Kits	27
3.1.3	Geräte	27
3.1.4	Software	28
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Studiendesign	28

3.2.2	Tiere	29
3.2.2.1	Tierhaltung	29
3.2.2.2	Trainingsexperiment	29
3.2.2.3	Probengewinnung.....	30
3.2.3	RNA-Isolation.....	30
3.2.4	Umschreiben der RNA in cDNA und Generierung der cDNA-library	31
3.2.5	Sequenzierung mittels <i>next generation sequencing</i>	32
3.2.6	Validierung der NGS-Expressionsdaten mittels qRT-PCR.....	34
3.2.6.1	Generierung und Auswahl der Primer	34
3.2.6.2	Umschreiben der RNA in cDNA	35
3.2.6.3	Anlegen der Verdünnungsreihe.....	36
3.2.6.4	LightCycler® qRT-PCR – Testen der Primerpaare.....	36
3.2.6.5	qRT-PCR im BioMark HD System	38
3.2.7	Funktionelle Analyse von Genfunktionen und -interaktionen mit Ingenuity® Pathway Analysis	41
3.2.8	Genauswahl zur funktionellen Interpretation.....	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Qualitätskontrolle der NGS-Daten.....	43
4.2	Genexpressionsunterschiede im Transkriptomprofil der Hypophyse trainierter und untrainierter DUHLB- und Kontrollmäuse	44
4.2.1	Anzahl der differentiell exprimierten Gentranskripte	44
4.2.2	Genexpressionsunterschiede, die in untrainierten DUHLB-Mäusen und trainierten Kontrollmäusen quantifiziert werden konnten	45
4.3	Validierung der NGS-Expressionsdaten mittels qRT-PCR.....	49
4.3.1	Funktionalität der Primerpaare.....	49
4.3.2	Vergleich der Expressionsdaten aus den NGS- und qRT-PCR-Messungen.....	50
4.4	Funktionelle Analyse der Genexpressionsunterschiede in der Hypophyse von untrainierten DUHLB- und trainierten Kontrollmäusen	53
4.4.1	Geninteraktionsnetzwerk-Analyse	54
4.4.2	<i>Upstream</i> -Regulatoren-Analyse	61
4.4.3	Funktionelle Zuordnung von Genen zu lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen.....	63
5	Diskussion	65
5.1	Angewandte Methodik	66
5.2	Funktionelle Analyse der Genexpressionsunterschiede in der Hypophyse von untrainierten DUHLB- und trainierten Kontrollmäusen	68
5.2.1	<i>Solute carrier</i> Transporter	69

5.2.2	Transkriptionsfaktor Estrogenrezeptor 1 und dessen regulierte Gene	71
5.2.3	Gene, die an Wachstumsprozessen beteiligt sind und in Assoziation zu <i>growth hormone</i> dargestellt werden.....	72
5.2.4	Gene, die funktionell zur <i>growth hormone</i> -Achse zugeordnet werden können.....	74
5.2.5	Gene, die am Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse beteiligt sind	76
5.2.6	Gene, die funktionell zur Adrenokortikotropes Hormon-Achse zugeordnet werden können.	78
5.2.7	Gene, die funktionell zur Oxytozin-Achse zugeordnet werden können	80
5.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	81
6	Zusammenfassung	83
7	Literaturverzeichnis.....	86
8	Anhang.....	100
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	100
8.2	Abbildungsverzeichnis	104
8.3	Tabellenverzeichnis	105
8.4	Verzeichnis der Supplementären Abbildungen.....	106
8.5	Verzeichnis der Supplementären Tabellen	107
8.6	Supplementäre Abbildungen.....	108
8.7	Supplementäre Tabellen	115
8.8	Lebenslauf	117
8.9	Thesen zur Dissertation	120
8.10	Selbstständigkeitserklärung	123
8.11	Danksagung	124

1 Einleitung

Die wissenschaftliche Basis der vorliegenden Arbeit stellen Untersuchungen zur Regulation des Energiestoffwechsels unter Kontrolle der Hypophyse bei Ausdauertraining dar. Diese wird anhand von Tiermodellen untersucht.

1.1 Regulation des Stoffwechsels

1.1.1 Mangel an Bewegung als Einfluss auf die Ausbildung metabolischer Erkrankungen

Stoffwechselerkrankungen wie die Adipositas und das Metabolische Syndrom werden für die medizinische Versorgung aufgrund einer steigenden Prävalenz in der Gesellschaft immer bedeutender. Laut dem Robert-Koch-Institut sind in Deutschland 54% der Erwachsenen übergewichtig (*body mass index* (BMI) $>25 \text{ kg/m}^2$) und 18,1% adipös (BMI $>30 \text{ kg/m}^2$) (Schienkiewitz et al., 2017). Das Metabolische Syndrom, als Risikofaktorenkomplex für kardiovaskuläre Erkrankungen, ist nach der *International Diabetes Federation* definiert über hohe zentrale Fettleibigkeit (Bauchumfang Europäer $\geq 80 \text{ cm}$ (Frauen), $\geq 94 \text{ cm}$ (Männer) oder BMI $>30 \text{ kg/m}^2$) und zwei der folgenden vier Kriterien: Gestörter Fettstoffwechsel mit hohen Triazylglyzerid (TAG)-Werten ($\geq 150 \text{ mg/dl}$) und geringen *high density* Lipoprotein Cholesterol-Werten ($<50 \text{ mg/dl}$ (Frauen), $<40 \text{ mg/dl}$ (Männer)), hoher Blutdruck (systolisch $\geq 130 \text{ mmHg}$ oder diastolisch $\geq 85 \text{ mmHg}$) sowie erhöhter Nüchternblutzuckerwert ($\geq 100 \text{ mg/dl}$) oder Diabetes mellitus Typ 2 (International Diabetes Federation, 2006). Das Metabolische Syndrom korreliert mit nahezu zweifacher Mortalitätsrate für den plötzlichen Herztod (Hess et al., 2017) sowie einem 1,5-fachem Anstieg der Gesamtmortalität (Mottillo et al., 2010). Auch bei adipöser Stoffwechsellage tritt eine circa (ca.) 1,5-fach höhere Gesamtmortalität auf (Xu et al., 2018).

Übergewicht und die damit verbundenen Risiken entstehen unter anderem, wenn die mit der Nahrung aufgenommene Energie den tatsächlichen Energieverbrauch übersteigt. Zur Prävention und Therapie von Adipositas und metabolischen Erkrankungen kann der Energieumsatz zum Beispiel durch Sport gesteigert werden. Die Weltgesundheitsorganisation empfiehlt eine sportliche Betätigung von 75 Minuten pro Woche bei hoher Aktivität beziehungsweise (bzw.) 150 Minuten pro Woche bei moderater Aktivität (Liu et al., 2018). Während sitzende Tätigkeiten und geringe körperliche Aktivität ein gesteigertes kardiovaskuläres Risiko bedingen, kann Sport eine kardiovaskuläre Anpassung sowie eine geringere Mortalität bewirken (Lear et al., 2017). Auch auf neurologische und psychiatrische Erkrankungen sowie die Ausbildung verschiedener Tumorarten wirkt Sport präventiv (McTiernan et al., 2019, Li et al., 2016). Aktuelle Forschungen konzentrieren sich auf eine Analyse des Stoffwechsels unter sportlichen Bedingungen, um mögliche metabolische Anpassungen zu identifizieren, therapeutisch zu nutzen und die Prävalenz und Mortalität von Stoffwechselerkrankungen zu senken.

1.1.2 Grundlagen des Energiestoffwechsels bei sportlicher Aktivität

Lipide und Kohlenhydrate stellen die wichtigsten Energielieferanten des Körpers dar. Dabei bestehen Unterschiede zwischen dem Stoffwechsel im Ruhezustand und dem Stoffwechsel bei sportlicher Aktivität. Im Ruhezustand müssen die grundlegenden, physiologischen Funktionen des Körpers, wie Atmung, Herzschlag, Verdauung oder neurologische Funktionen, aufrechterhalten werden. Dieser Grundumsatz macht mit 60-75% den größten Teil des täglichen Energiebedarfs aus. Sämtliche Bewegungsabläufe und Aktivitäten erbringen den Leistungsumsatz, welcher zusammen mit dem Grundumsatz den individuellen Energieverbrauch bildet. Bei submaximalen Aktivitäten mit geringer bis moderater Intensität (<65% maximale Sauerstoffaufnahme (V_{O2max})) wird die zusätzliche Energie überwiegend aus der Oxidation von Fettsäuren (FS) zu Azetyl-CoA in den Muskeln bereitgestellt (Abbildung 1). Azetyl-CoA wird zur Energiegewinnung über Zitratzyklus und Atmungskette in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt. FS, welche in Form von TAG gespeichert werden, stammen dabei aus Depots des Fettgewebes sowie zum geringen Teil aus intramuskulären Fettspeichern. Durch das submaximale Training findet eine, durch β -adrenerge Rezeptoren induzierte, gesteigerte Lipolyse statt (van Hall, 2015, Jeppesen und Kiens, 2012). FS werden an Albumin gebunden über die Blutgefäße zum Muskel transportiert. Eine gesteigerte Perfusion und Proliferation der Kapillaren in Folge des Trainings erlaubt eine bessere Aufnahme der FS aus dem Fettgewebe und eine bessere Versorgung des Muskels (van Hall, 2015). Die Aufnahme in die Muskelzellen erfolgt über einen Fettsäuretransporter, den *cluster of differentiation* (CD) 36, der in Folge des Trainings vermehrt exprimiert wird (Schenk und Horowitz, 2006). Auch hohe Östrogenspiegel führen zu einer vermehrten Expression des Transporters im Muskel (Oosthuyse und Bosch, 2010). Diesbezüglich fanden Kiens *et alii* (et al.) höhere Konzentrationen von CD36 bei Frauen (Kiens et al., 2004). Die Oxidation der FS findet in den Mitochondrien statt. Eine höhere mitochondriale Dichte bedingt eine höhere Kapazität für die Oxidation. Während langkettige FS auf die Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT) in der Membran der Mitochondrien angewiesen sind, können kurzkettige FS unabhängig von CPT über die Membran der Mitochondrien diffundieren. Bei submaximalem Training steigt die Konzentration der CPT und somit der Transport der FS über die Membran (Schenk und Horowitz, 2006). Bei hohen Intensitäten wird die Versorgung der Muskeln mit FS limitiert, da nicht ausreichend CPT zum FS-Transport zur Verfügung steht (Purdom et al., 2018, Stephens et al., 2007).

Wird die Trainingsintensität gesteigert, nimmt die Oxidation der FS ab und die Oxidation der Kohlenhydrate zu, bis der Kohlenhydratmetabolismus den der FS übersteigt (Brooks und Mercier, 1994). Die Kohlenhydrate stammen vor allem aus Glykogenspeichern aus dem Muskel, die nach dem Training durch eine schnellstmögliche Kohlenhydratzufuhr wieder aufgefüllt werden müssen (Hauswirth und Le Meur, 2011, Ivy, 2004). Da die Menge der Glykogenspeicher erschöpflich ist, hängt die Ausdauer von der Kapazität der Glykogenspeicher sowie dem Zeitpunkt, an dem keine FS-Oxidation mehr genutzt wird, ab (Horowitz und Klein, 2000, Brooks und Mercier, 1994).

Während Glukosemangels, beispielsweise (bspw.) im Hungerzustand oder nach intensiver sportlicher Aktivität, werden vermehrt FS zu Azetyl-CoA oxidiert. Wenn die Kapazität der weiterführenden Reaktionen zur Energiegewinnung wie des Zitratzykluses durch Substratmangel überschritten wird, kann das Azetyl-CoA zu Ketonkörpern umgewandelt werden. Die Ketonkörper Azeton, Azetoazetat und β -Hydroxybutyrat sind chemische Verbindungen, die in der Leber gebildet werden, um weiterhin eine Versorgung extrahepatischer Gewebe, vor allem des Gehirns, zu gewährleisten (Puchalska und Crawford, 2017).

Der Metabolismus unter Aktivität ist abhängig von individuellen Faktoren wie Geschlecht, Alter, Trainingszustand, Aktivitätsart und Genetik (Purdom et al., 2018, Peric et al., 2016). Zudem geht Training mit individuellen Anpassungen einher. Eine vermehrte Oxidation von FS schon im Ruhezustand sowie eine schnelle Induktion der Oxidation von FS in der Anfangsphase eines Trainings kann durch das Training induziert sein (Romijn et al., 1993). Der Schnittpunkt, an welchem die Kohlenhydrat- die FS-Oxidation übersteigt, ist individuell von den durch Training induzierten Reaktionen, welche die FS-Oxidation fördern, sowie den durch höhere Trainingsintensität induzierten Reaktionen, welche den Kohlenhydratmetabolismus steigern, abhängig (Brooks und Mercier, 1994).

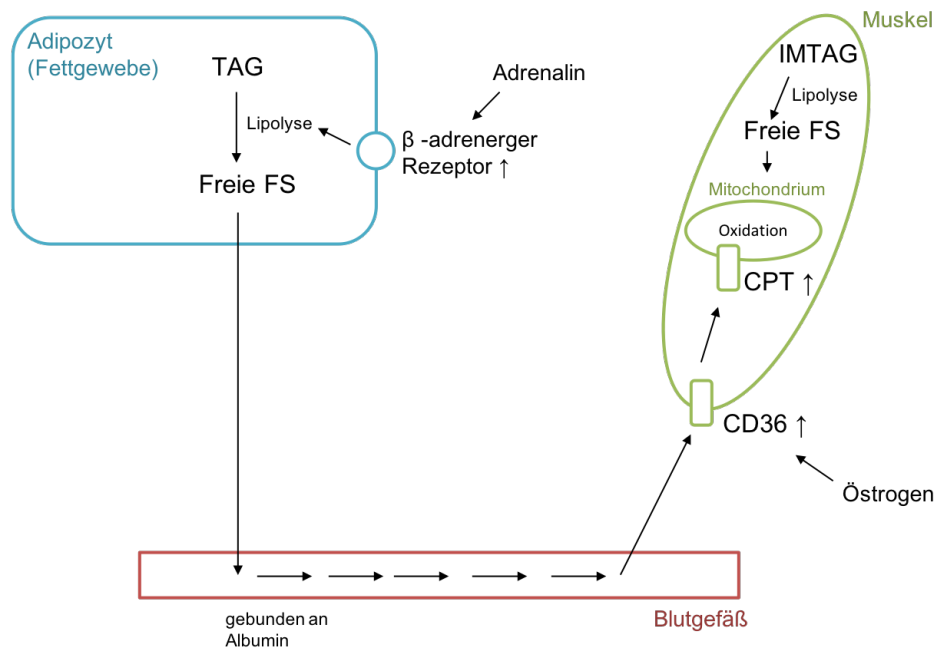


Abbildung 1: Fettsäuremetabolismus bei submaximaler Aktivität (<65% $V_{O_{2max}}$). TAG aus dem Fettgewebe werden zu freien FS lipolysiert. Freie FS werden, gebunden an Albumin, über die Blutbahn zum Muskel transportiert und dort zur Energiegewinnung für die körperliche Aktivität oxidiert. Auch im Muskel befindliche TAG werden lipolysiert und die freien FS oxidiert. CD36 = cluster of differentiation 36, CPT = Carnitin-Palmitoyl-Transferase, FS = Fettsäuren, IMTAG = intramuskuläre Triacylglyceride, TAG = Triacylglyceride, $V_{O_{2max}}$ = maximale Sauerstoffaufnahme, \uparrow = erhöhte Expression

1.1.3 Kommunikation der am Stoffwechsel beteiligten Organe

Die Mobilisierung von Fettdepots während körperlicher Aktivität, insbesondere im Zusammenspiel von Muskel und Fett mit Leber und Gehirn, ist ein weltweiter Forschungsschwerpunkt. Adipozyten und Myozyten fungieren dabei nicht nur als Effektoren, sondern können auch selbst endokrine Funktionen ausüben. Sie produzieren humorale Zytokine und Wachstumsfaktoren, genannt Adipokine (aus Adipozyten) und Myokine (aus Myozyten), welche in die Blutbahn sekretiert werden. Über Adipokine und Myokine sowie weitere Hormone und auch Stoffwechselmetaboliten wie FS können die am Stoffwechsel beteiligten Organe untereinander kommunizieren (Fiuza-Luces et al., 2018). Auch das Vorhandensein von Rezeptoren für die Signalegeber in den jeweils anderen Organen lässt darauf schließen (Sarmiento-Cabral et al., 2017). Das neurologische System wird durch bewegungsinduzierte Sekretion von Myokinen und Adipokinen beeinflusst und kann gleichzeitig selbst über die Stimulation des vegetativen Nervensystems Einfluss auf den Stoffwechsel nehmen.

(siehe 1.1.2). Außerdem existieren neuroendokrine Achsen, ausgehend von Hypothalamus und Hypophyse, die über Hormonsekretion, direkt via Rezeptorstimulation in Effektororganen oder indirekt über die Anregung von Drüsen im Körper, Einfluss auf den Stoffwechsel nehmen können. Die neuroendokrine Wirkung der Hypophyse auf den Metabolismus soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.2 Hypophyse

1.2.1 Anatomie

Die Hypophyse gehört zu den neuroendokrinen Organen des Körpers und befindet sich an der Basis des Gehirns (Aumüller, 2017). Sie besteht aus einem größeren Vorderlappen (HVL, Adenohypophyse) und einem kleineren Hinterlappen (HHL, *pars neuronalis*, Neurohypophyse). Während der HHL als Aussackung des Hypothalamus embryologisch zum zentralen Nervensystem gehört, entsteht der HVL aus einem Teil des Rachendaches und gehört zum endokrinen System (Barkhoudarian und Kelly, 2017). Der HHL ist über den Hypophysenstiel (*infundibulum*) mit dem Hypothalamus verbunden. Der Übergang zwischen HHL und Hypothalamus erfolgt an der *eminetia mediana*, einer stark vaskularisierten Zone, welche zum *infundibulum* gehört (Trepel, 2017). Die räumliche Nähe zeigt, dass Hypothalamus und Hypophyse auch funktionell eng miteinander verbunden sind.

1.2.2 Physiologie und Funktion

Die Hypophyse hat durch ihre vielfältige Hormonproduktion Einfluss auf den gesamten Organismus. Dabei kontrolliert sie andere Drüsen des Körpers und wird wegen ihrer zentralen Stellung auch als „*master gland*“ bezeichnet (Barkhoudarian und Kelly, 2017). Während die Hormone des HVL in verschiedenen hypophysären Zelltypen produziert werden und dies durch *releasing*- und *inhibiting*-Moleküle aus parvozellulären Kerngebieten des Hypothalamus kontrolliert wird, werden die Hormone des HHL in magnozellanulären Kernen des Hypothalamus produziert und über axonalen Transport zur Speicherung in den HHL gebracht und von dort sekretiert (Lüllmann-Rauch, 2015). Im HVL werden *growth hormone* (GH), Prolaktin (PRL) sowie die auf Drüsen wirkenden, glandotropen Hormone Adrenokortikotropes Hormon (ACTH), Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH), Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) gebildet. Die im Hypothalamus gebildeten Hormone Antidiuretisches Hormon (ADH) und Oxytozin (OXT) werden aus dem HHL freigesetzt. Im Folgenden werden die verschiedenen Hormone des HVL und HHL sowie deren Funktionen im Körper vorgestellt (Überblick in Tabelle 1).

Tabelle 1: Hormone der Hypophyse

		Bildungszelltyp	Hauptzielorgan
Hormone HVL	GH	Somatotrope Zellen	Leber, Knochen, Muskel, Fett
	PRL	Mammatrope Zellen	Brustdrüse
	ACTH	Kortikotrope Zellen	Nebennierenrinde
	TSH	Thyreotrope Zellen	Schilddrüse
	LH/FSH	Gonadotrope Zellen	Gonaden
Hormone HHL	ADH	Magnozelluläre Kerne des Hypothalamus	Niere, Gefäße
	OXT	Magnozelluläre Kerne des Hypothalamus	Brustdrüse, Uterus

Abgebildet sind die Hormone der Hypophyse, der jeweilige Zelltyp, in dem sie gebildet werden, und das Hauptzielorgan. Die Hormone werden HVL oder HHL zugeordnet. ACTH = Adrenokortikotropes Hormon, ADH = Antidiuretisches Hormon, FSH = Follikel-stimulierendes Hormon, GH = *growth hormone*, HHL = Hypophysenhinterlappen, HVL = Hypophysenvorderlappen, LH = Luteinisierendes Hormon, OXT = Oxytozin, PRL = Prolaktin, TSH = Thyroidea-stimulierendes Hormon

1.2.2.1 *Growth hormone*

Der häufigste Zelltyp im HVL sind die GH-synthetisierenden somatotropen Zellen. Die Sekretion wird durch *growth hormone-releasing hormone* (GHRH, stimulierend über *growth hormone-releasing hormone* Rezeptor (GHRHR) (Anderson et al., 2004)) und Somatostatin (SST, inhibierend über Somatostatinrezeptor 2 (SSTR2) (Ben-Shlomo und Melmed, 2010)) über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse reguliert. Außerdem wirkt Ghrelin aus dem Gastrointestinaltrakt über den Ghrelin-Rezeptor (GHSR) stimulierend (Anderson und Scanes, 2012). Die Hauptfunktion von GH besteht in der Anregung des Wachstums verschiedener Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskel, Leber oder Niere. GH beeinflusst zudem den Stoffwechsel. Unter katabolen Bedingungen, wie bspw. beim Fasten, wirkt GH lipolytisch (Wasinski et al., 2019). Durch erhöhte Expression von β -adrenergen Rezeptoren potenziert GH den Einfluss der Katecholamine auf die Lipolyse im Fettgewebe (Beauville et al., 1992). Mäuse mit vergleichsweise geringen GH-Serumspiegeln wiesen eine Akkumulation von subkutanen Fettdepots auf (Duran-Ortiz et al., 2018). Seine Funktion vermittelt GH über den GH-Rezeptor (GHR), der in Leber, Fettgewebe, Muskel, Knochen und Gehirn exprimiert wird. In Mäusen mit *GHR-knockout* (KO) kann ein erhöhter GH-Serumspiegel gemessen werden. Dieser geht mit einer vermehrten prozentualen Fettmasse und zwergenhaftem Erscheinungsbild im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen einher (Berryman et al., 2010).

GH vermittelt teilweise Funktionen über ein nachgeschaltetes Hormon, den *insulin-like growth factor* (IGF) 1. Über eine Aktivierung des GHR erfolgt die Produktion von IGF1 hauptsächlich in der Leber sowie zum geringeren Teil auch in anderen Geweben wie Fett oder Muskel. Bei Mäusen, bei denen spezifisch in der Leber die GHR-Expression unterdrückt wurde, konnten erheblich reduzierte Serumspiegel von IGF1 beobachtet werden, während die lokalen *messenger* Ribonukleinsäure-(mRNA) Level von IGF1 in Muskel, Fettgewebe und Knochen anstiegen. Es konnten in diesen Tieren zudem gestiegene GH-Serumspiegel nachgewiesen werden, die durch ein Wegfallen des negativen *feedbacks* von IGF1 auf die GH-Produktion erklärt werden können (List et al., 2014, Fan et al., 2009).

Somatotrope Zellen exprimieren den Leptinrezeptor (LEPR). Über das Adipokin Leptin werden Informationen zwischen Fettgewebe und Arealen im Gehirn wie Hypothalamus, Hypophyse oder

Hirnstamm vermittelt, um das Ernährungsverhalten bei hohen Fettmassen anzupassen. Das Hungergefühl wird unterdrückt, das Sättigungsgefühl gesteigert. Eine Überproduktion von Leptin, verursacht durch hohe Fettmassen, kann zu chronisch erhöhten Leptin-Serumspiegeln und daraus folgend einer Ausbildung von Resistenzen gegenüber dem Adipokin führen. Die folglich weitere, überschüssige Nahrungsaufnahme resultiert in einer weiteren Akkumulation von Fettmassen (Zieba et al., 2020, Cottrell und Mercer, 2012). LEPR-KO-Mäuse zeigten signifikante Reduktionen der Level von GH und GH-mRNA in der Hypophyse (Odle et al., 2016). Dies steht vermutlich in einem Zusammenhang mit dem Hypophysen-spezifischen positiven Transkriptionsfaktor 1 (POU1F1), der die GH-Bildung in somatotropen Zellen vermittelt und dessen Proteinmenge in weiblichen LEPR-KO Mäusen vermindert war (Allensworth-James et al., 2018, Odle et al., 2016).

1.2.2.2 Prolaktin

PRL wird von laktotropen Zellen des HVL sekretiert. Es fungiert als Laktationshormon, sorgt für mütterliches Verhalten und eine verringerte Fruchtbarkeit. Zudem wirkt PRL auch außerhalb der Schwangerschaft bzw. Stillzeit und bei männlichen Säugern: Eine erhöhte PRL-Ausschüttung dient bspw. der Unterdrückung der Stressreaktion (Kirk et al., 2017). PRL induziert die Lipogenese und hemmt die Lipolyse in Adipozyten (Barrett et al., 2018). Diese funktionellen PRL-Spiegel sind deutlich geringer als innerhalb der Stillzeit (Patil et al., 2014).

1.2.2.3 Adrenokortikotropes Hormon

Der häufigste glandotrope Zelltyp des HVL sind die kortikotropen Zellen, welche Proopiomelanokortin (POMC) und daraus ACTH synthetisieren (Dallman et al., 1987). Dieses wird aus dem Vorläuferpeptid POMC durch die Prohormonkonvertase 1/3 (PCSK1) gespalten (Wardlaw, 2011). Mit diesem Vorgang assoziiert ist das Inhibitorprotein *cAMP-responsive element-binding protein 3-like 1* (CREB3L1) sowie das Inhibitorprotein der Konvertase (PCSK1n) (Greenwood et al., 2020). ACTH kann selbst weiter in das α -Melanozyten-stimulierende Hormon und das Kortikotropin-ähnliche Zwischenlappenpeptid gespalten werden (Wardlaw, 2011). Die ACTH-Sekretion aus der Hypophyse wird durch die im Hypothalamus produzierten Hormone *corticotropin-releasing hormone* (CRH, über den *corticotropin-releasing hormone* Rezeptor 1 (CRHR1)) und ADH (über den Vasopressin 1b Rezeptor (AVPR1B)) stimuliert. Beide vermitteln dabei sowohl unter basalen als auch unter stressinduzierten Bedingungen die ACTH-Ausschüttung (Ramos et al., 2016, Tanoue et al., 2004). Bei inflammationsbedingtem Stress kann die Sekretion zudem auch über Zytokine, wie Interleukin-6, vermittelt werden (Bethin et al., 2000).

ACTH stimuliert in der *zona fasciculata* der Nebennierenrinde die Ausschüttung der Glukokortikoide Kortisol (Mensch) bzw. Kortikosteron (Nager) sowie in sehr hohen Konzentrationen auch die Ausschüttung von Androgenen und Mineralokortikoiden aus den übrigen Schichten der Nebennierenrinde. Hohe Glukokortikoidspiegel im Blut hemmen über den negativen Rückkopplungsmechanismus die CRH-, ADH- und ACTH-Sekretion in Hypothalamus und Hypophyse. Dies kann sowohl schnell über nicht-genomische Effekte als auch langsamer über die Regulation der

Genexpression von CRH und ADH im Hypothalamus sowie POMC im HVL geschehen (Keller-Wood, 2015). Glukokortikoide werden auch als Stresshormone bezeichnet und unter Einfluss von physischem und psychischem Stress vermehrt sekretiert. Das Einstellen einer Eu- bis Hyperglykämie durch Stimulation der Glukoneogenese, Inhibition der Glukoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe sowie einer geringeren Sekretion von Insulin bewirkt unter Stressbedingungen eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit Glukose. Zudem werden vermehrt Fett- und Aminosäuren mobilisiert (Tanaka et al., 2017, Magomedova und Cummins, 2016). Eine Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, wie ein verminderter negativer *feedback*-Mechanismus oder ein chronischer Hyperkortisolismus, kann zu der Ausbildung eines metabolischen Syndroms (siehe 1.1.1) führen (Karatsoreos et al., 2010).

Neben der Funktion in der Hypophysen-Nebennieren-Achse bewirkt ACTH bei Nagern eine stressinduzierte Lipolyse im Fettgewebe (Chaves et al., 2011). Außerdem induziert ACTH, direkt sowie indirekt über die Expressionssteigerung von Thermogenin (*uncoupling protein 1*, UCP1), die Bräunung im weißen Fettgewebe (*browning*, Umwandlung von weißen in braune Adipozyten zur Thermogenese) (van den Beukel et al., 2014).

1.2.2.4 Thyroidea-stimulierendes Hormon

Aus den thyreotropen Zellen des HVL wird TSH sekretiert. TSH und auch GH stimulieren die Schilddrüse zur Iodaufnahme sowie zur Produktion und Sekretion der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4). Zudem beeinflusst TSH in der Peripherie die Umwandlung von T4 in das funktionell wirksame T3. Schilddrüsenhormone haben vielfältige Einflüsse, bspw. auf Stoffwechsel, Energieaufwand, Thermogenese, Gehirnentwicklung und Wachstum (Carmean et al., 2014). Im Fettgewebe potenzieren sie die adrenergen Funktionen (Brent, 2012) und regulieren die Thermogenese im braunen Fettgewebe über die Expression von UCP1 (Ribeiro et al., 2010). Während einer Hyperthyreose steht der erhöhte Ruheenergieaufwand im Zusammenhang mit Gewichtsverlust, gesteigerter Lipolyse sowie geringeren Cholesterol- und TAG-Serumspiegeln (Sinha et al., 2018). Es wird vermutet, dass Schilddrüsenhormone die Verteilung der freien FS auf die verstoffwechselnden Organe beeinflussen. Unter hyperthyreotischen Bedingungen werden die FS in oxidative Organe wie Leber und Muskel aufgenommen, unter hypothyreotischen Bedingungen in das Fettgewebe zur Speicherung (Klieverik et al., 2009). Welche genauen Mechanismen dies vermitteln ist momentan noch unklar. Vermutlich wird die Expression von Fettsäuretransportern und Fettsäurebindungsproteinen (FABP) in den jeweiligen Geweben durch die Schilddrüsenhormone reguliert (Sinha et al., 2018). Neben lipolytischen Effekten beeinflussen die Schilddrüsenhormone auch die Lipogenese durch Stimulation der Expression von lipogenetischen Enzymen wie Fettsäuresynthase und Azetyl-CoA-Carboxylase. Die Adipogenese wird in Initialstadien durch eine Hemmung der Adipozytendifferenzierung inhibiert. In den folgenden Stadien wird die Adipogenese durch die Schilddrüsenhormone gesteigert (Carmean et al., 2014).

1.2.2.5 Luteinisierendes Hormon und Follikel-stimulierendes Hormon

Die Ausschüttung von FSH und LH aus den gonadotropen Zellen der Adenohypophyse wird durch das *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) stimuliert. FSH/LH bewirken bei Frauen in den Ovarien die Produktion von Östrogenen und Progesteron und regen somit das Wachstum der Follikel an. Östrogene vermitteln über negatives *feedback* die verminderte Sekretion von FSH/LH. Wird eine bestimmte Konzentrationsschwelle an Östrogenen über mindestens 24 bis 48 Stunden überschritten, führt dies zu einer gesteigerten LH-Sekretion (positives *feedback*) und damit zur Ovulation (Howles, 2000). Bei Männern wird durch FSH/LH die Produktion von Testosteron in den Leydig-Zellen des Hodens sowie die Spermatogenese stimuliert (Simoni et al., 1999). Veränderungen der Östrogenspiegel sind mit Veränderungen im Stoffwechsel assoziiert. Bei postmenopausalen Frauen resultiert die geringere Produktion von Östrogenen in erhöhter peripherer Fettmasse und Insulinresistenz. Die Behandlung mit exogenen Östrogenen kann präventiv auf Insulinresistenz und ernährungsbedingte, periphere Adipositas wirken. Auch bei Männern gibt es Hinweise, dass Östrogen stoffwechselassoziierte Einflüsse vermittelt. So konnte bei mit exogenen Östrogenen behandelten männlichen Mäusen eine Abnahme der hepatischen TAG-Level beobachtet werden (Dakin et al., 2015). Die stoffwechselassoziierten Funktionen werden überwiegend über den Östrogenrezeptor (ESR) α vermittelt, welcher durch das Gen ESR1 kodiert wird und auch in der Hypophyse exprimiert ist (Schreihöfer et al., 2000).

1.2.2.6 Oxytozin

Das Peptidhormon OXT wird in magnozellulären Kerngebieten im Hypothalamus gebildet und von dort via axonalem Transport in den HHL gebracht. Vom HHL wird OXT kalziumabhängig sezerniert. An der kalziumabhängigen Sekretion sind CD38 und *transient receptor potential cation channel, subfamily M member 2* (TRPM2) beteiligt (Higashida et al., 2018, Zhong et al., 2016). Stress, Essensaufnahme und soziale Aspekte sind Stimulatoren für die OXT-Sekretion aus dem HHL. OXT fördert die Wehentätigkeit während der Geburt sowie die Milchejektion postpartum, vermittelt soziales Verhalten, wie bspw. die Mutter-Kind-Beziehung, wirkt analgetisch und hat einen kardioprotektiven Einfluss (Jankowski et al., 2016, Onaka et al., 2012). Zudem beeinflusst OXT den Stoffwechsel. Hohe OXT-Serumspiegel führen zu einer Reduktion der Körpermasse durch verminderte Nahrungsaufnahme, gesteigerte Lipolyse und gesteigerte FS-Oxidation (Lawson et al., 2020, McCormack et al., 2020). Außerdem führen sie zu verbesserter Glukosetoleranz und Insulinresistenz sowie vermehrter Aufnahme von Glukose in Muskel und Fettgewebe (Deblon et al., 2011, Lee et al., 2008). Andere Quellen beschreiben erhöhte Blutglukosespiegel und adipogenetische Einflüsse nach einer zweiwöchigen Behandlung mit OXT (Altirriba et al., 2014, Eckertova et al., 2011). Die Funktionen werden über den Oxytozinrezeptor (OXTR) vermittelt, der ubiquitär im Körper exprimiert wird (Ding et al., 2019).

1.2.2.7 Antidiuretisches Hormon

ADH aus dem Hypothalamus steigert über die Aktivierung des Vasopressin 2 Rezeptors die Rückresorption von Wasser im distalen Tubulus sowie in den Sammelrohren der Niere durch den Einbau von Aquaporin 2 Kanälen. In hohen Konzentrationen kann es über den Vasopressin 1a Rezeptor zu einer Vasokonstriktion führen. Stimuli für die Sekretion von ADH sind Hypovolämie und Hyperosmolarität (Gonzalez et al., 2020). ADH hat über die synergistische Funktion zu CRH einen Einfluss auf die Produktion von ACTH im HVL und wirkt so indirekt lipolytisch (siehe 1.2.2.3). Rofe und Williamson hingegen detektierten weniger freie FS und weniger Ketonkörper nach ADH-Behandlung und schlussfolgerten einen anti-lipolytischen Effekt (Rofe und Williamson, 1983).

1.2.3 Einfluss der Hypophyse auf den Stoffwechsel unter körperlicher Aktivität

Unter akuten Stressbedingungen, wie körperlicher Aktivität, passt sich die Hormonproduktion und -sekretion in der Hypophyse den Gegebenheiten an. Dabei ist die Sekretion abhängig von Art, Intensität und Dauer des Trainings. Außerdem ist der Zeitpunkt des Tages, an dem das Training durchgeführt wird, von Bedeutung, da die Sekretion der meisten Hypophysenhormone einem zirkadianen Rhythmus unterliegt (Anderson, 2019). Bei Ausdaueraktivität werden vor allem freie FS, die durch vermehrte Lipolyse bereitgestellt werden (siehe 1.1.2), metabolisiert. Dies suggeriert eine Erhöhung der lipolytisch-wirkenden Hypophysenhormone durch körperliche Aktivität. Aktuelle Studien untersuchten die Hormonspiegel der Hypophysenhormone während und nach körperlicher Aktivität bzw. Training. Daraus können Rückschlüsse auf die Aktivität der Hypophyse gezogen werden.

Anderson beschrieb eine erhöhte Sekretion von GH und ACTH trainingsassoziiert, während eine verminderte Ausschüttung der Thyroid- und Gonadenhormone bestimmt wurde (Anderson, 2019). Nindl et al. führten eine Studie mit gesunden Männern durch und fanden nur bei länger dauerndem aerobem Training (zwei Stunden) eine erhöhte GH-Sekretion, während kurzes aerobes Training (eine Stunde) und Widerstandstraining zu keiner Änderung führten (Nindl et al., 2014). In Assoziation zu aerobem Training konnten außerdem sowohl höhere als auch niedrigere Kortisolspiegel gemessen werden, da diese abhängig von Dauer und Intensität des Trainings waren (Anderson, 2019). Sato et al. und Popovic et al. beschrieben zudem Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten Athleten: Nach einem Training wurden bei untrainierten Menschen höhere Kortisolspiegel bestimmt als bei trainierten Menschen (Popovic et al., 2019, Sato et al., 2016). Des Weiteren wurden nach Trainings mit hoher Intensität und kurzer Dauer, wie bspw. Sprint-Trainings, erhöhte Kortisolspiegel gemessen (Rodrigues de Araujo et al., 2018). Außerdem stiegen bei schnelleren Athleten die Kortisol- und GH-Spiegel stärker an als bei langsameren Athleten (Vingren et al., 2016). Dies könnte entweder eine höhere Leistung unter erhöhten Hormonspiegeln suggerieren oder aber die höheren Hormonspiegel zeigten eine höhere Belastung an, die wiederum die Ausschüttung der Hormone bedingt. In anderen Studien wurden niedrigere Kortisolspiegel in Assoziation zum Training gemessen (Anderson, 2019). Popovic et al. konnten außerdem erhöhte Serumspiegel an freiem Testosteron nachweisen (Popovic et al., 2019). Auch Sato et al. fanden erhöhte Serumspiegel der Sexualsteroiden Östrogen, Dehydroepiandrosteron und Testosteron nach Training mit hoher Intensität bei Athleten

und Nicht-Athleten (Sato et al., 2016). TSH-Serumspiegel in männlichen Ratten sanken nach zweiwöchiger Aktivität im Laufrad (Uribe et al., 2014). Jong et al. beschrieben erhöhte Spiegel von OXT im Speichel von Männern und Frauen nach einem Lauf (Jong et al., 2015). Yüksel et al. hingegen beschrieben nur bei weiblichen Mäusen gesteigerte Serum-OXT-Spiegel sowie erhöhte OXT-Spiegel im Gehirn, nachdem diese sechs Wochen lang in Käfigen mit Laufrädern gehalten wurden (Yüksel et al., 2019). Weitere Studien beschrieben erhöhte GH- und Kortisolspiegel in Serum- oder Speichelproben sowie verringerte Testosteronspiegel in Serum- oder Speichelproben nach Ausdauertraining (Vingren et al., 2016, Frayn, 2010, Mastorakos und Pavlatou, 2005). Zusammenfassend betreffen kontrovers diskutierte, trainingsassoziierte Erhöhungen von Hormonleveln vor allem GH, ACTH und OXT.

Die Hypophyse ist in den Gewebe-*crosstalk*, der den Stoffwechsel bestimmt, eingebunden (siehe 1.1.3). Somit unterliegt auch sie Einflüssen von anderen am Stoffwechsel beteiligten Organen. Über die Bindung von Signalgebern, wie Adipokinen oder Myokinen, an Rezeptoren der Hypophyse können in Zellen Signalwege ausgelöst werden, welche auf Transkriptom- oder Proteomebene zu Veränderungen führen. Die damit einhergehende differentielle Ribonukleinsäure (RNA)- und Proteinexpression sowie veränderte Aktivität von Proteinen können wiederum die Aktivität der Hypophyse regulieren. Folglich werden andere Organe über die veränderte Aktivität der Hypophyse beeinflusst, so dass ein Zusammenspiel vieler Faktoren entsteht. Die veränderte Aktivität der Hypophyse, die sich in veränderten Hormonspiegeln unter körperlicher Aktivität zeigt, unterliegt somit auch Änderungen auf RNA- und Proteinebene. Um diese zu untersuchen, kann bspw. die Analyse der Genexpression genutzt werden.

1.3 Untersuchung von Stoffwechselanpassungen anhand der Genexpression

1.3.1 Regulation der Genexpression

Für die Beschreibung von Anpassungserscheinungen in Organismen an äußere Reize, wie bspw. Anpassungen des Energiestoffwechsels an körperliche Aktivität, kann die hypothesenfreie Betrachtung der Expression der Gesamtheit aller Gene auf RNA-Ebene Anwendung finden.

Die Eigenschaften eines jeden Organismus werden unter anderem durch seine Gene bestimmt. Dabei besitzt jedes Individuum seine eigene, individuelle Erbinformation, die in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in den Zellen vorliegt. Die Zellen eines Organismus enthalten zwar alle die gleiche DNA und damit die gleichen Gene, sind aber aufgrund der zelltypspezifischen Genexpression unterschiedlich differenziert mit unterschiedlichen Morphologien und Funktionen. Die Genexpression in den Zellen kann gemessen und Regulationen dieser Expression als Antwort auf interne und externe Stimuli ermittelt werden. Gene, die unabhängig von dieser Genregulation sind und konstitutiv exprimiert werden, bezeichnet man als Haushaltsgene (*housekeeping genes*) (Hardin et al., 2015, Twellmeyer, 2007).

Die Regulation der Genexpression kann auf unterschiedlichen Ebenen erfolgen. Duplikationen, Deletionen sowie Neuaneordnungen von DNA-Abschnitten, Methylierungen und Histonmodifikationen bestimmen die Regulation auf Genomebene. Weiterhin kann die Regulation auf RNA-Ebene durch Transkriptionsfaktoren, die an bestimmte Abschnitte der DNA binden und dort

die Aktivität der RNA-Polymerase regulieren (aktivieren oder reprimieren), stattfinden. Dadurch wird die Transkription, die Umschrift von DNA in RNA, reguliert. Das Zwischenergebnis stellt das Transkriptom, die Gesamtheit der RNA einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt, dar. Außerdem kann die Regulation der Genexpression auch auf posttranskriptionaler Ebene, unter anderem via alternativem Spleißen, Kontrolle der Translation und posttranslational, bspw. durch differentielle Proteinfaltung, stattfinden (Hardin et al., 2015, Yilmaz und Grotewold, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression auf Transkriptomebene untersucht, da das Transkriptom als Bindeglied zwischen Genom und Proteom unterschiedliche Zellzustände, Entwicklungsstadien und Regulationsmechanismen widerspiegelt. Des Weiteren ist die Untersuchung der Genexpression auf Transkriptomebene durch methodische Fortschritte in den Fokus der aktuellen Forschungen gerückt (Supplitt et al., 2021).

1.3.2 Messung der Genexpression auf Transkriptomebene

Im Wesentlichen stehen drei Verfahren im Mittelpunkt der Genexpressionanalyse: Die Mikroarray-Technik, die quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) und die RNA-Sequenzierung (RNAseq) (Supplitt et al., 2021).

Der Analyse mittels Mikroarrays liegt eine Hybridisierung der Proben-RNA mit kurzen einzelsträngigen Oligonukleotidsonden, die komplementär zu den Sequenzen bekannter Transkripte sind und die auf dem Mikroarraychip aufgebracht sind, zu Grunde. Das impliziert eine Notwendigkeit von a priori Kenntnissen über das Transkriptom (Schena et al., 1995). Das Verfahren ermöglicht die Analyse vieler Gene gleichzeitig und ist relativ kostengünstig. Jedoch fällt die akurate Messung der Expression von Transkripten mit geringer bzw. sehr hoher Häufigkeit (Abundanz) schwer (Supplitt et al., 2021, van der Kloet et al., 2020).

Mithilfe Sequenzierungs-basierter Methoden werden Transkripte direkt über die Abfolge ihrer Nukleotide analysiert. Aus anfänglichen Verfahren wie der Herstellung von *expressed sequence tags*, die nur einen geringen Durchlauf hatten (Adams et al., 1991), haben sich Methoden wie die serielle Analyse der Genexpression und die Cap-Analyse der Genexpression entwickelt, die einen höheren Durchlauf haben und die Genexpression exakter widerspiegeln (Shiraki et al., 2003, Velculescu et al., 1995). Hierbei limitierend waren allerdings die Kosten und die Analysen unbekannter Transkripte sowie alternativer Spleißformen. Die Entwicklung der Sequenzierungs-basierten Methode des *next generation sequencing* (NGS), zu der auch RNAseq gehört, hat die Transkriptomanalyse modernisiert. RNAseq bietet einen hohen Durchlauf und somit eine Analyse des gesamten Transkriptoms und mehrerer Proben gleichzeitig. Neben der Quantifizierung der Genexpression können mithilfe von RNAseq auch bislang unbekannte oder seltene Transkripte nachgewiesen, alternative Spleißisoformen identifiziert und Allel-spezifische Genexpressionsanalysen durchgeführt werden (Supplitt et al., 2021, van der Kloet et al., 2020, Lowe et al., 2017). Hierfür wird isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und anschließend die Expression über ein *mapping* der sequenzierten *reads* zu annotierten Transkripten bestimmt (Griffith et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit werden der Einfachheit halber Daten, die über RNAseq gewonnen wurden, als NGS-Daten bezeichnet.

Sinnvoll ist oftmals eine Validierung der Expressionsdaten aus der Sequenzierung, um Schlussfolgerungen zu untermauern. Hierfür eignet sich die qRT-PCR, die über eine Vervielfältigung spezifischer Abschnitte der isolierten Proben-RNA eine Expressionsanalyse ausgewählter Transkripte ermöglicht (Rajkumar et al., 2015). Dabei werden spezifische Primer benötigt, welche die Sequenz, die amplifiziert werden soll, das Amplikon, begrenzen (Erich, 1989). Da die DNA als Doppelstrang vorliegt und zu beiden Strängen ein komplementäres Gegenstück synthetisiert werden soll, werden für jedes Amplikon zwei Primer, das Primerpaar, bestehend aus *forward*- und *reverse*-Primer, benötigt. Als DNA-Polymerase wird die thermostabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *thermus aquaticus*, die Taq-Polymerase, verwendet (Saiki et al., 1988). Für die Quantifizierung der DNA-Moleküle in Echtzeit wird zur Detektion ein Fluoreszenzsignal benötigt. Ein gängiges System ist die Markierung mit SYBRTM *green*, der reversibel zwischen zwei benachbarte Basenpaare (bp) an die DNA bindet (Smith und Osborn, 2009). Da während der PCR-Zyklen immer mehr DNA-Produkte synthetisiert und somit immer mehr SYBRTM *green* Farbstoff an die DNA gebunden wird, steigt dazu korrelierend das detektierte Fluoreszenz-Signal. Wird das Signal kontinuierlich während der PCR gemessen, kann anhand dessen eine Quantifizierung der Amplifikation über mathematische Regression erfolgen. Um die Quantifizierung unspezifischer Amplifikate auszuschließen, wurde am Ende des Temperaturprogramms eine Schmelzkurve erstellt. Bei Amplifikation eines spezifischen PCR-Produktes zeigt sich in der Schmelzkurve nur ein *peak* (Ruijter et al., 2014). Vorteile der qRT-PCR sind neben der vergleichenden Quantifizierung und Schnelligkeit, die Möglichkeit, mehrere Proben gleichzeitig zu messen und so eine hohe Automatisierung zu erreichen (Supplitt et al., 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Genexpressionsanalyse RNAseq und qRT-PCR verwendet. Sowohl für RNAseq als auch für die qRT-PCR werden biologische Nukleinsäure-Proben benötigt, aus denen über die Sequenzierungsmethoden die Daten für eine bioinformatische Auswertung gewonnen werden. Für die bioinformatische Analyse kann das Programm Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®) genutzt werden, da es Untersuchungen über Funktions- und Regulationsbeziehungen von Genen ermöglicht. IPA nutzt zur funktionellen Zuordnung der differentiell exprimierten Gentranskripte (DEGs) und zur Visualisierung von bekannten und vorhergesagten Interaktionen zwischen den DEGs eine große Literaturdatenbank (Krämer et al., 2014).

1.4 Untersuchung von Stoffwechselanpassungen unter körperlicher Aktivität anhand von Mausmodellen

Da die Hypophyse als kleines, nah am Gehirn gelegenes Organ schwer zu erreichen ist und invasive Probenentnahmen beim lebenden Menschen nur schwer möglich sind, werden für die Grundlagenforschung Proben aus Tiermodellen genutzt. Spezielle Mausmodelle, die unter Vermeidung der Inzucht über viele Generationen auf spezifische Merkmale selektiert wurden, eignen sich aufgrund ihrer komplexen Genetik für die biomedizinische Grundlagenforschung. Wegen der genetischen Variabilität von Tier zu Tier in den Auszuchtlinien, sind Generalisierung und Übertragung der Erkenntnisse aus Experimenten auf andere Populationen, bspw. den Menschen, besser möglich als bei Inzuchtstämmen (Tuttle et al., 2018, Zuberi und Lutz, 2016).

Die Forschergruppe um T. Garland erstellte eine Mauslinie, die auf hohe freiwillige Laufleistung im Laufrad langzeitselektiert wurde. In aktuellen Studien der letzten fünf Jahre untersuchten sie dieses Modell unter anderem auf muskelspezifische Anpassungen (Castro und Garland, 2018, Kay et al., 2018, Kelly et al., 2017) und Adaptionen in Fettgewebe und Nahrungsaufnahme (Cadney et al., 2021, Hiramatsu und Garland, 2018), den Einfluss von endogenen Substanzen wie Kortikosteron (Singleton und Garland, 2019) und exogenen Substanzen wie Koffein (Claghorn et al., 2017) auf die Laufleistung sowie Zusammenhänge zwischen belohnungsassoziierten Veränderungen im Gehirn und hoher Laufleistung (Schmill et al., 2021, Hillis et al., 2020, Zhang et al., 2018). Kortikosteron wird unter anderem als Antwort auf ACTH, welches in der Hypophyse synthetisiert wird, sekretiert (siehe 1.2.2.3). Mäuse, die auf hohe freiwillige Laufleistung selektiert wurden, hatten zweifach höhere Kortikosteron-Serumspiegel als nicht-selektierte Kontrollmäuse. Nach einer zusätzlichen Kortikosteronzufuhr über das Trinkwasser besaßen sie eine höhere Laufgeschwindigkeit, -distanz und -dauer im Laufrad als Kontrollmäuse. Dennoch führte die zusätzliche Kortikosteronzufuhr zu verringerten Leber- und Muskelmassen sowie vermehrter subkutaner Fettmasse (Singleton und Garland, 2019). Ob ein Zusammenhang zwischen hohen Kortikosteron-Serumspiegeln und erhöhter Aktivität der Hypophyse in diesem Mausmodell besteht, ist bislang unklar.

Auch das Forschungsinstitut für Nutztierbiologie in Dummerstorf (FBN Dummerstorf) verfügt über ein genetisch heterogenes, auf hohe Laufleistung selektiertes Mausmodell, welches zur Hypothesenuntersuchung einer Stoffwechselanpassung unter Ausdauerleistung genutzt werden kann. Dies ist die Dummerstorfer hoch-Laufbandlinie DUHLB.

1.4.1 Dummerstorfer Langzeitselektionslinie für hohe Laufbandleistung DUHLB

Im Gegensatz zu dem Modell von T. Garland ist die Dummerstorfer Linie DUHLB auf eine hohe Laufleistung auf einem computergesteuerten Laufband selektiert worden (Brenmoehl et al., 2013, Falkenberg et al., 2000). Als Basis für die Etablierung der DUHLB-Linie diente die in den siebziger Jahren aus jeweils vier In- und Auszuchtlinien über drei Generationen systematisch generierte Kontrolllinie Fzt:DU, die auch als Dummerstorfer Kontrolllinie (DUK) bezeichnet wird. Bis heute wird die ursprüngliche genetische Vielfalt durch zufälliges, nicht selektiertes Paaren der Mäuse, bei gleichzeitiger Vermeidung von Inzucht, aufrechterhalten (Abbildung 2). Dietl et al. bestätigten die „einzigartige genetische Struktur“ (Dietl et al., 2004) in jeder Generation. Die auf hohe Laufleistung selektierte DUHLB-Linie wurde seit den frühen achtziger Jahren in Dummerstorf aus dem DUK-Stamm in einer divergenten Selektion generiert (Abbildung 2). Selektiert wurden dabei Männchen nach der Anpaarung anhand eines einmaligen, spontanen, submaximalen Laufs. Dafür liefen die ca. 70 Tage alten männlichen Mäuse nach einem bestimmten Geschwindigkeitsschema (Start: 12 m/min, Ende: 38 m/min) auf einem Laufband (10% Steigung). Anhand der Distanz des Laufes in Metern wurde die individuelle Leistung der Mäuse bestimmt (Brenmoehl et al., 2013). Die Nachkommen der Väter mit der besten Laufleistung wurden für die Weiterzucht verwendet (Falkenberg et al., 2000).

Es kann vermutet werden, dass durch die Dimension des Selektionsexperimentes der DUHLB-Linie (50-100 Familien pro Generation) und durch die Minimierung des Inzuchtkoeffizienten der genetische Hintergrund deutlich komplexer ist als bei anderen Selektionsmodellen, die in einem ähnlichen Kontext untersucht wurden. Die Erkenntnisse im Kontext von funktionellen Anpassungen

in der Hypophyse im Rahmen eines Ausdauertrainings beziehen sich vor allem auf Serum- und Speichelproben sowohl von Tieren als auch von menschlichen Athleten und nicht-trainierten Kontrollen (siehe 1.2.3). Die Genexpression auf RNA-Ebene wurde in diesem Zusammenhang bisher nur gezielt von einzelnen Transkripten, bspw. von Rezeptoren von *releasing*- und *inhibiting*-Hormonen, gemessen (Uribe et al., 2014, Park et al., 2005). Transkriptomweite Analysen zur Hypophyse mittels Sequenzierungs-basierter Methoden wurden zwar durchgeführt, bezogen sich aber nicht auf den Kontext des Ausdauertrainings (Fu et al., 2019, St-Amand et al., 2011).

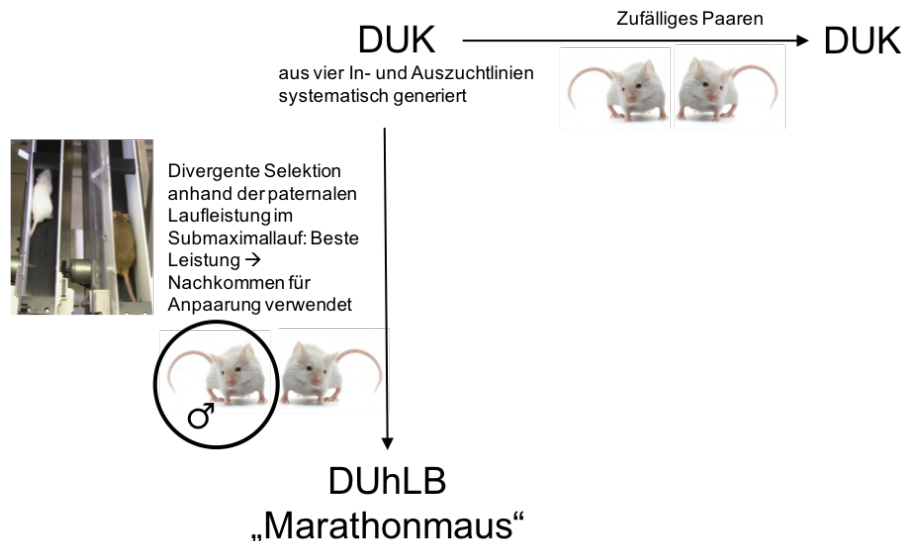


Abbildung 2: Generierung der DUhLB- und DUK-Linien. Die DUK-Linie wurde aus vier In- und Auszuchtlinien systematisch generiert und die Linie über zufälliges Paaren der Mäuse aufrechterhalten. Die DUhLB-Linie wurde aus der DUK-Linie über eine Selektion nach paternaler Laufleistung in einem Submaximaltest auf dem Laufband generiert. Nur die Nachkommen der männlichen Mäuse, welche die beste Leistung zeigten, wurden für die weitere Zucht verwendet. DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie

Da sich Selektion nicht nur auf das eigentliche Zuchtmerkmal auswirkt, sondern multidimensionale physiologische und körperliche Adaptionen bewirkt, entwickelten sich nach über 135 Generationen Tiere, welche, im Vergleich zur Ausgangslinie, neue und eigene Merkmale aufweisen (Brenmoehl et al., 2017, Falkenberg et al., 2000), die im nächsten Abschnitt näher beleuchtet werden.

1.4.2 Bekannte Anpassungen im Stoffwechsel von DUhLB-Mäusen

Bisherige Untersuchungsergebnisse (Tabelle 2) deuten darauf hin, dass die auf hohe Laufbandleistung selektierten DUhLB-Mäuse über Generationen hocheffiziente Mechanismen der Stoffwechselanpassung entwickelt haben, die dazu führten, dass sie im Vergleich zu Kontrollen eine bis zu fünffach erhöhte Laufausdauer aufweisen (Brenmoehl et al., 2013). Die energetisch-metabolischen Anpassungen der DUhLB-Mäuse durch die Selektion erlauben es ihnen, während eines Ausdauertrainings ihre im Ruhezustand angelegten Ressourcen zu mobilisieren.

Tabelle 2: Bekannte Anpassungen im Stoffwechsel der DUhLB-Linie durch Selektion und körperliche Aktivität

	DUhLB in Ruhe im Vergleich zur DUK in Ruhe	Durch freiwillige, körperliche Aktivität in DUhLB induziert, im Vergleich zur nicht-trainierten DUhLB
Subkutanfett	Lipogenese ↑ Akkumulation peripherer Fettdepots ↑ PGC1α ↑ (mRNA) Mitochondriale Biogenese ↑ <i>Browning</i> ↑ UCP1 ↑ (P) Tbx1 ↑ (mRNA) PPARα ↑ (mRNA) Irisin ↑	Mobilisation peripherer Fettdepots ↑ Oxidation von Fettsäuren ↑ PGC1α ↑ (mRNA, P) Tfam ↑ (P) Mitochondriale Biogenese ↑ <i>Browning</i> ↑ UCP1 ↑ (P)
Leber	Lipidsynthese ↑ Glykolyse ↓ Glykogensynthese ↑ Glukoneogenese ↑ Pentosephosphatweg ↑ PPARδ ↑ (mRNA) Sirt1 ↑	TAG ↓ Cholesterol ↓
Muskel		PGC1α ↑ (mRNA) Irisin ↑ (nur bei Submaximallauf auf dem Laufband)
Serum	TAG ↑ Cholesterol ↑ Irisin ↑ Progesteron ↑ Östrogen ↓ Testosteron ↓	TAG ↓ Irisin ↑ (nur bei Submaximallauf auf dem Laufband)

Darstellung der bisherigen Erkenntnisse (Stand 2020) über Stoffwechseladaptionen, Stoffwechselprodukte und am Stoffwechsel-beteiligter Moleküle der Mäuse der DUhLB-Linie im Vergleich zur Kontrolllinie DUK in Ruhe und der Erkenntnisse über körperlich aktive Mäuse der DUhLB-Linie im Vergleich zu nicht-aktiven DUhLB-Mäusen. Körperliche Aktivität bezieht sich hierbei auf das Laufen im Laufrad; einzelne Ausnahmen sind gekennzeichnet. Der Stoffwechsel nicht-körperlich aktiver DUhLB-Mäuse ist durch den Energieaufbau geprägt. Freiwillige körperliche Aktivität im Laufrad führt zu Energiemobilisation. DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, mRNA = mRNA-Expression, P = Proteinexpression, PGC1α = Peroxisome-Proliferator-aktivierter Rezeptor-Gamma-Koaktivator 1-alpha, PPAR = Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, Sirt1 = Sirtuin 1, TAG = Triacylglyceride, Tbx1 = T-box 1, Tfam = Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A, UCP1 = Thermogenin, ↑ = gesteigert, ↓ = vermindert

In Ruhe ist der Energiestoffwechsel durch Lipogenese und Akkumulation von peripheren Fettdepots sowie einer erhöhten Lipidsynthese in der Leber, die mit hohen TAG- und Cholesterolspiegeln im Serum korreliert, gekennzeichnet (Brenmoehl et al., 2013). Am Leberfettstoffwechsel sind auch mikroRNAs (miRNA) aktiv beteiligt (Ohde et al., 2016a). Eine verringerte Glykolyse, eine gesteigerte Glukoneogenese und eine gesteigerte Glykogensynthese sorgen für einen aktiven Aufbau von Glykogenspeichern in der Leber (Brenmoehl et al., 2013). Der vor allem bei erhöhter Steroid- und Lipidsynthese aktivierte Pentosephosphatweg ist ebenfalls durch einen hohen Durchlauf im Ruhezustand gekennzeichnet (Brenmoehl et al., 2013). Eine wichtige Rolle in der Regulation des Kohlenhydrat-, FS- und Cholesterolmetabolismus in der Leber der DUhLB-Mäuse scheint das Sterol regulatorische Element-bindende Protein 1 (SREBP1) zu spielen, denn RNA-Analysen konnten große

Transkript-Mengen von SREBP1-regulierten Genen bestätigen (Ohde et al., 2016b). Des Weiteren konnten signifikant erhöhte Transkriptlevel vom Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) δ , der als Mediator für erhöhte Lipidsynthese und einen hohen Glukosefluss durch den Pentosephosphatweg gilt, in Leberextrakten der DUHLB-Mäuse im Ruhezustand gemessen werden (Brenmoehl et al., 2013). PPARs sind als Transkriptionsfaktoren in weite Teile des Energiemetabolismus involviert (Christofides et al., 2021). Die Expression der Deazetylase Sirtuin 1 (Sirt1), welche ebenfalls an der Energiegewinnung beteiligt ist, war in Leberextrakten der DUHLB-Maus im Vergleich zu Kontrollen deutlich erhöht (Brenmoehl et al., 2013). Diese beiden Moleküle stehen in engem Kontakt miteinander. Wahrscheinlich vermittelt PPAR δ seine lipogenetischen Effekte über Sirt1 (Brenmoehl et al., 2013).

Während freiwilliger körperlicher Aktivität im Laufrad, welches permanent über drei Wochen zur Verfügung stand, sind DUHLB-Mäuse in der Lage, effizient von der Akkumulation zur Mobilisation von Körperfett zu wechseln. Periphere Fettdepots, vor allem die perinephrischen und subkutanen Depots, werden durch die körperliche Aktivität reduziert (Brenmoehl et al., 2020, Brenmoehl et al., 2015). Zudem konnten hepatische Cholesterolverte sowie hepatische- und Serum-TAG-Werte als verringert gemessen werden (Brenmoehl et al., 2020, Brenmoehl et al., 2015). Die gesteigerte Lipolyse während körperlicher Aktivität geht mit einer gesteigerten Oxidation von FS einher. Hohe Spiegel von an der Oxidation beteiligten Enzymen im Subkutanfett der DUHLB-Linie führten zur Untersuchung der Regulatoren der mitochondrialen Biogenese. Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-Gamma-Koaktivator 1-alpha (PGC1 α), der die mitochondriale Biogenese hauptsächlich induziert, konnte auf mRNA- und Proteinebene durch körperliches Training im Subkutanfett der DUHLB-Linie als erhöht exprimiert identifiziert werden (Brenmoehl et al., 2015). Auch Sirt1, welches einerseits durch Detazetylierung Transkriptionsfaktoren aktiviert und andererseits selbst als Transkriptionsfaktor fungiert und somit in mitochondrialer Proliferation und Energiegewinnung resultiert, war in Folge körperlicher Aktivität in DUHLB-Tieren als erhöht exprimiert nachzuweisen (Brenmoehl und Hoeflich, 2013). Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (Tfam), der bereits in Ruhe im Vergleich zur Kontrolllinie erhöht war, wies nach freiwilliger körperlicher Aktivität eine hohe mitochondriale und nukleäre Proteinexpression auf (Brenmoehl et al., 2015). Daraus konnte geschlossen werden, dass bei körperlich aktiven DUHLB-Mäusen eine erhöhte mitochondriale Biogenese stattfindet. Weitere Untersuchungen des Fettgewebes in DUHLB-Mäusen zeigten phänotypisch ein deutlich dunkleres Subkutanfett als das von Kontrolltieren, was auch histologisch bestätigt werden konnte (Brenmoehl et al., 2017). Es ist bekannt, dass aus weißen Adipozyten sogenannte *brite* Adipozyten konvertieren können, die Eigenschaften von braunen Adipozyten besitzen (Cannon und Nedergaard, 2004). Eine Induktion der Expression des exogenen Myokins Irisin oder von Irisin-Präkursoren, wie *fibronectin Type III domain-containing 5* (FNDC5), kann *browning* von weißen Adipozyten in Nagern und Menschen auslösen und induziert die Thermogenese über eine gesteigerte Expression von UCP1. Auch hier spielt PGC1 α als Marker für die erhöhte mitochondriale Biogenese und die Induktion des Fettzell-*brownings* über eine erhöhte Expression von FNDC5 eine Rolle (Boström et al., 2012). Irisin induziert ebenso die Expression des Mediators PPAR α , der eine Erhöhung der Level von UCP1 vermittelt. Die mRNA-Expression von T-box 1 (Tbx1) als Marker für *brite* Adipozyten, der auch mit UCP1 interagiert (Markan et al., 2020), ist in Ruhe erhöht, wird durch körperliche Aktivität aber nicht verändert (Brenmoehl et al., 2017). Nach akuter physischer Aktivität in Form eines Submaximallaufs auf dem Laufband konnten hohe Spiegel des Myokins Irisin in Muskelextrakten und im Serum von DUHLB-Mäusen detektiert werden (Brenmoehl et al., 2014). FNDC5, von dem Irisin abgespalten wird, war nachweisbar (Brenmoehl et al., 2017).

Freiwillige körperliche Aktivität auf dem Laufrad hatte keinen Einfluss auf Irisin- oder FNDC5-Level, während die Level von UCP1 und PPAR α im Subkutanfett der DUhLB-Mäuse erhöht waren und ein deutliches *browning* detektiert werden konnte (Brenmoehl et al., 2020, Brenmoehl et al., 2017). Die Kombination aus erhöhten Levels von Myokinen und genregulatorischen Anpassungen, die in verschiedenen Organen (Leber, Fettgewebe und Muskel) aufgezeigt werden konnten, deutet auf ein Zusammenspiel der Organe zur Regulation des Stoffwechsels hin.

Bisherige Untersuchungen im DUhLB-Modell konzentrierten sich hauptsächlich auf die Analyse von Regulatoren in Fett- und Lebermetabolismus. Der Stoffwechsel eines Organismus wird aber noch durch den Einfluss weiterer Organe und deren Kommunikation über Botenstoffe untereinander bestimmt (siehe 1.1.3). Wie in 1.2 beschrieben, nimmt auch die Hypophyse als übergeordnetes, neuroendokrines Organ Einfluss auf den Stoffwechsel, sowohl in Ruhe als auch während körperlicher Aktivität. Katabole, neuroendokrine Achsen wie die ACTH-, GH- oder OXT-Achse vermitteln unter körperlicher Aktivität lipolytische Signale. Ohde et al. untersuchten bereits Serumspiegel der Steroidhormone, die unter anderem als Antwort auf Hypophysenhormone sekretiert werden, und zeigten erhöhte Progesteron- sowie verringerte Testosteron- und Östrogenspiegel in DUhLB-Mäusen im Vergleich zu Kontrollen. Kortikosteronspiegel differierten nicht zwischen Mäusen beider Mauslinien (Ohde et al., 2016b). Diese bisherigen Erkenntnisse zu Steroidhormonen sowie die unterschiedliche Expression von Regulatoren und Myokinen, in Kombination mit den bisher bekannten metabolischen Anpassungen an eine hohe Laufleistung und die phänotypischen Besonderheiten von Mäusen der DUhLB-Linie, lassen Zusammenhänge und Interaktionen mit weiteren Organen wie bspw. der Hypophyse vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Anpassungen auf transkriptioneller Ebene in der Hypophyse der DUhLB-Mäuse ermittelt. Außerdem wurde untersucht, welche Regulationen ein körperliches Training auf Transkriptomebene in der Hypophyse bewirkt.

2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsunterschiede betrachtet, die ein Laufbandtraining auf transkriptioneller Ebene in der Hypophyse von Mäusen bewirkt. Es wurde untersucht, ob eine Langzeitselektion nach hoher Laufleistung zu ähnlichen Expressionsunterschieden im Transkriptom führte wie ein dreiwöchiges Laufbandtraining bei nicht-selektierten Kontrollen.

Dafür wurden RNA-Proben der Hypophyse der langzeitselektierten Mauslinie DUhLB sowie von Kontrolltieren entnommen. Ein Teil der Mäuse beider Linien wurde einem Trainingsexperiment unterzogen, während ein anderer Teil nicht trainiert wurde. Um die Expressionsunterschiede zu quantifizieren, wurden die RNA-Proben der Hypophyse bereits im Vorfeld dieser Arbeit für eine NGS-Analyse verwendet. Die NGS-Expressionsdaten wurden mittels qRT-PCR für ausgewählte Gene technisch validiert. Anschließend erfolgte eine bioinformatische Analyse mittels der Software Ingenuity Pathway Analysis®, um die transkriptionellen Expressionsunterschiede in Geninteraktionsnetzwerken zu visualisieren und bezüglich der oben genannten Zielsetzung zu interpretieren.

Folgende Fragen wurden dabei untersucht:

Zum Transkriptomprofil der Hypophyse trainierter und untrainierter DUhLB- und Kontrollmäuse

- Wie viele Transkripte sind in der Hypophyse der Mäuse, im Vergleich von DUhLB und DUK bzw. trainiert und untrainiert, differentiell exprimiert?
- Wie ist die Verteilung an höher- und niedriger exprimierten Transkripten in den oben genannten Vergleichen?

Zur Validierung der NGS-Expressionsdaten mittels qRT-PCR

- Wie viele Primer konnten mittels LightCycler erfolgreich getestet und somit für die Validierung der NGS-Expressionsdaten genutzt werden?
- Welche Expressionsdaten der ausgewählten DEGs konnten mittels qRT-PCR erfolgreich validiert werden?
- Besteht eine positive Korrelation zwischen den Expressionsdaten aus den Messungen mit NGS und qRT-PCR?

Zur bioinformatischen Analyse mittels IPA® bezogen auf die Untersuchung von langzeitselektierten DUhLB-Mäusen versus DUK-Mäusen ohne Training und nicht-selektierten DUK-Kontrollen mit versus ohne Laufbandtraining

- Welche Zahl an Transkripten kann sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, als differentiell exprimiert identifiziert werden?
- Können diese DEGs funktionellen Gengruppen zugeordnet werden?
- In wie weit partizipieren die ermittelten DEGs an Hypophysen-spezifischen Geninteraktionsnetzwerken?
- Gibt es DEGs, die zu lipolytisch wirkenden Hypophysenachsen zugeordnet werden können?

3 Material und Methoden

Die für die Untersuchung der Fragestellung (siehe Kapitel 2) genutzten Methoden sowie die notwendigen Materialien werden nachfolgend vorgestellt.

3.1 Material

3.1.1 Primer zur Messung der Genexpression in der qRT-PCR

Für die Validierung der NGS-Expressiondaten mittels qRT-PCR wurden 43 Gene und fünf Haushaltsgene, anhand der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Kriterien, ausgewählt. Für diese Gene wurden Primer ausgewählt und generiert (Tabelle 3; für Generierung und Auswahl der Primer siehe 3.2.6.1). Alle 48 Primer wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland bezogen.

Tabelle 3: Primer zur Messung der Genexpression in der qRT-PCR

Genname	Primernamen	Sequenz
ATPase 13 A5	ATP13A5_F	TCTGGTAGCTGACCACCACT
	ATP13A5_R	CAGGAGTTACTGTCTTCCAGCA
CaM Kinase-ähnliches Vesikel-assoziiertes Protein	CAMKV_F	GGTTATCGCTTCCTGCCTGT
	CAMKV_R	GGCCCGGAAGATTTACAGA
Kaliziumkalmodulin-abhängige Proteinkinase 2A	CAMK2A_F	ACATCCACAACCTGTGGTCCC
	CAMK2A_R	ACCCATCAGTGCATCCAGGTA
Chromobox 3 Pseudogen 7	CBX3-ps7_F	GTTGAAGAGGCAGAGCCTGA
	CBX3-ps7_R	GCATCTGTGAACCCCTTCCA
Cadherin 22	CDH22_F	TACGTGGGCAAGATCCACTC
	CDH22_R	GTTTCTGTGCTCCCGGTCCA
Chitinase	CHIA1_F	GGAATTGGTGCCCTTACCTC
	CHIA1_R	GTCATAGCCAAGCCACTCGT
Claudin 19	CLDN19_F	CCATGGCCAACCTCGGCTTCCA ⁵
	CLDN19_R	TTACACACCCAGGGGGCCCT ⁵
Kollagen Typ 3 Kette A1	COL3A1_F	AAGGCTGCAAGATGGATGCT
	COL3A1_R	GGAGGGCCATAGCTGAAGT
Zelluläres Retinsäure-bindendes Protein 1	CRABP1_F	GATGTGGTCTGGACCCGAG
	CRABP1_R	AGCTGGCCACCTTTACTCC
<i>double homeobox B-like 1</i>	DUXBL1_F	GCATCTCTGAGTCTCAAATTATGACTTG ⁶
	DUXBL1_R	GCGTTCTGCTCCTTCTAGCTTCT ⁶
Östrogenrezeptor 1	ESR1_F	CCAATTCTGACAATCGACGC ¹
	ESR1_R	TCTTATCGATGGTGCATTGTT ¹
Fibronectin 1	FN1_F	AGCCAGGAACCGAGTACACC
	FN1_R	ACTTCACCCTGCAAAGCAACC
Ionotroper GABA-A Rezeptor Untereinheit A3	GABRA3_F	CTCTCTGCTTCGGGGAAGTG
	GABRA3_R	CTTGGCTAGTGGTTCCAGGG
Glutamatdecarboxylase 1	GAD1_F	CCAGCACGTACTCCTGTGAC
	GAD1_R	GAAGATGCCATCAGCTCGGT
Glyzeraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Pseudogen	GM4804_F	GTCTGCTCTTCACGTGGCAA
	GM4804_R	CTCGCCTTGTCTGTGCCATT
G protein-gekoppelter Rezeptor 149	GPR149_F	TGCAGTTCAGGCACATCTGA
	GPR149_R	TTCAAAGTGTCTTTTCTTGATGACA

Glutamat metabotroper Rezeptor 4	GRM4_F	TCGGCTTCACCATGTACACC
	GRM4_R	ACTGAAGCGCTCAGACTCAC
Histon Cluster 1 H2A Familienmitglied L	HIST1H2AL_F	GTGCTGGAGTACCTAACGGC
	HIST1H2AL_R	TGTTGAGCTCCTCGTCGTTG
Histon Cluster 2 H2B Familienmitglied F	HIST2H2BB_F	AAGCGCTCGACCATCACTTC
	HIST2H2BB_R	ACGTCTCTGCTGCACTTCAC
Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase	HPRT1_F	TCCTCCTCAGACCGCTTTT
	HPRT1_R	CCTGGTTCATCATCGCTAATC
Haupthistokompatibilitätskomplex I	H2-Q7_F	CGGGAGCGGGTTGTAAAGTC
	H2-Q7_R	GGACACAGCGGTGTGGAAT
<i>insulin-like growth factor 2</i>	IGF2_F	AGTTCTGCTGCTGCTTATTG ⁴
	IGF2_R	CTACCTGGCTAGTCATTGG ⁴
<i>insulin receptor-related protein</i>	INSRR_F	AGTGTCACCATGTGGTTCGT
	INSRR_R	CTGCAATTTCCCTGCCATC
<i>potassium inwardly-rectifying channel subfamily J member 13</i>	KCNJ13_F	CAATGCAAGAAGGCACTGGG
	KCNJ13_R	GGTCAGTCCTGTGTGGACTC
Leptinrezeptor	LEPR_F	TGAGCAGCGGTGCCATC ²
	LEPR_R	GTACCCGTCAGTTTCACATGATATATTG ²
Myosin-bindendes Protein C1	MYBPC1_F	GAGATCCGCAAGCCTAGTCC
	MYBPC1_R	GAAGGACAGCCCACCTTTCA
Podozin	NPHS2_F	CTCAGAAAGCTGGGGCTGC
	NPHS2_R	GGACCTGCTACTTCTCCCGT
Prodynorphin	PDYN_F	CGACAGGGGGAGACTCTCAT
	PDYN_R	GGTGGCCGATCCAAGATTCA
Phosphoglyzeratkinase 1 Version 1	PGK1v1_F	CAGTCTAGAGCTCCTGGAAGGT
	PGK1v1_R	TGTGGA AAAACAGCAGGTTAGC
Phosphoglyzeratkinase 1 Version 2	PGK1v2_F	CAGTCTAGAGCTCCTGGAAGGT
	PGK1v2_R	AGGAGCACAGGAACCAAAGG
Proteinphosphatase 1 regulatorische Untereinheit 17	PPP1R17_F	TAGTAGCAGGGCAGTCCGAT
	PPP1R17_R	TGAGGGTCTTCAGAGGAGAGG
saures Ribosomales 60S-Protein P2	RPLP2_F	GACGATGATCGGCTCAACAAG
	RPLP2_R	ACCCTGAGCGATGACATCCT
Ribosomales Protein 19	RPL19_F	CAATGCCAACTCCCGTCAGC
	RPL19_R	TCTTGGATTCCCGGTATCTC
Ribosomales Protein 26	RPL26_F	GAACCGCAAACGGCATTTCA
	RPL26_R	TAGTGTCCGCGAACAACCTG
Ribosomales Protein s2-Pseudogen 13	RPS2-ps13_F	GTGCTCCAAGGAGGTTGCT
	RPS2-ps13_R	GGGCTTGCCAATCTTGTTC
Ribosomales Protein s26-Pseudogen 1	RPS26-ps1_F	CTGTGCCATCCATAGCAAGGT
	RPS26-ps1_R	TCTGTCTTACAAAACGGCCTC
Serpine Familie A Mitglied 1	SERPINA1B_F	GCAGCAGCTACAGTCTTTGAA
	SERPINA1B_R	GGAAGGATGACATCGTAGGGT
<i>solute carrier family 6 member 13</i>	SLC6A13_F	AGACCTCAGGCAGAACTTCAC
	SLC6A13_R	CGTTCCAGGGTACCATCTTCC
<i>solute carrier family 7 member 11</i>	SLC7A11_F	CTCCGAGGAGCAAGAGGAGTA
	SLC7A11_R	GATCACTGTTTCGGTCGTGACT
<i>solute carrier family 13 member 3</i>	SLC13A3_F	TCCACAGTGTGATGTGGTG
	SLC13A3_R	TCACCGCTTTAGCCTGATCC
<i>solute carrier family 13 member 4</i>	SLC13A4_F	CTAAGCCTTGGGCCGAGAAA
	SLC13A4_R	AGAGAGAGCAGCTGTAGGCT
<i>solute carrier family 22 member 8</i>	SLC22A8_F	TCCTGGTGGGTACCAGAGTC ⁷
	SLC22A8_R	AACCAGGCCAGAGAGAGACA ⁷
<i>schlafen family member 8</i>	SLFN8_F	TCCTGTCTGAAGACCCGATA
	SLFN8_R	TGCGTAGATGGTCAAGTCTGG
Sphingosinkinase 1	SPHK1_F	ATCCCTTGGAGTCGGTGTC
	SPHK1_R	CAGATCCAATCTGTCCACGG
Synaptotagmin 2	SYT2_F	TTCAACGAGTCCTTCAGCTTC ³
	SYT2_R	CCCAGTTTGTCTGTAGTCTAGC ³
Osteoprotegerin	TNFRSF11B_F	AGGGCATACTTCCTGTTGCC
	TNFRSF11B_R	TGTTTCATTGTGGTCTCGGG

Vitronektin	VTN_F	CCTAAATCCTCGGACGGACG
	VTN_R	GGGTCCCTTGATCAGTGGTG
Wnt Familienmitglied 6	WNT6_F	GAGACGATGTGGACTTCGGG
	WNT6_R	AGCCCATGGCACTTACACTC

Gene (Auswahlkriterien siehe 3.2.6) sowie Primersequenzen (Generierung und Auswahl der Primersequenzen in 3.2.6.1), die für die Validierung der NGS-Expressionsdaten mit qRT-PCR genutzt wurden. ¹ (Avtanski et al., 2014), ² (Bryzgalova et al., 2006), ³ (Dorval et al., 2014), ⁴ (Jahangiri et al., 2018), ⁵ (Khairallah et al., 2014), ⁶ (Wu et al., 2010), ⁷ (Wu et al., 2009). F = *forwardprimer*, NGS = *next generation sequencing*, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion, R = *reverseprimer*

3.1.2 Kits

Folgende Kits wurden verwendet (geordnet nach Auftreten im Text).

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
TRIzol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNase I (Baseline-Zero DNase)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zymo® RNA Clean & Concentrator	Zymo Research, Irvine, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit	Illumina, Berlin, Deutschland
Agilent DNA 1000 Chip Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
KAPA qPCR Library Quantification Kit	KAPA-Biosystems, Roche, Wilmington, USA
GoScript™ Reverse Transcription Kit	Promega Corporation, Madison, USA

3.1.3 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet (geordnet nach Auftreten im Text).

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Makrolonkäfige Typ II	EBECO, Castrop-Rauxel, Deutschland
Computer-gestütztes Laufband	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
NanoDrop™ ND 1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
ThermoCycler	Conquer Scientific, San Diego, USA
HiSeq2500	Illumina, Berlin, Deutschland
Lightcycler® 480	Roche, Indianapolis, USA
BioMark HD Fluidigm®-System	Fluidigm®, San Francisco, USA

3.1.4 Software

Folgende Software und Datenbanken wurden verwendet (geordnet nach Auftreten im Text).

Tabelle 6: Verwendete Software

Anwendung	Software/Datenbank
Programme, zur Bearbeitung und Auswertung der Daten aus dem NGS	FastQC (Version 0.11.5)
	Hisat2 (Version 2.1.0)
	HTSeq (Version 0.8.0)
	edgeR (Version 3.20.1)
Primergenerierung: Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Primergenerierung: Recherche der Zugangsnummern der Gene für PrimerBLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=
	http://www.ensembl.org/index.html
LightCycler®	LightCycler®480 (Software Version 1.5)
Fluidigm® qRT-PCR	Fluidigm Real-Time PCR Analysis, San Francisco, USA
	Data Analysis Gene Expression, San Francisco, USA
Bioinformatische Netzwerkanalysen	Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®), Qiagen, USA
Literaturrecherche für Hypophysen-Achsen	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
Korrelationsberechnungen und Abbildungen	Microsoft Excel 2018 (Version 16.16.24)
	GraphPad Prism (Version 8.4.2)

NGS = *next generation sequencing*, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Für die Untersuchung der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit wurde das in Abbildung 3 dargestellte Studiendesign entworfen. Im Rahmen eines Tierexperimentes wurden Gewebeproben der Hypophyse von langzeitelektierten DUHLB-Mäusen und Kontrollen gewonnen. Aus den Gewebeproben wurde die RNA isoliert, in DNA umgeschrieben und anschließend mittels NGS sequenziert. Der eigene Arbeitsanteil bestand in der Validierung der NGS-Expressionsdaten mittels qRT-PCR sowie einer bioinformatischen Analyse der Genexpressionsdaten. Letztere diente der Einordnung und Interpretation der Genexpressionsdaten im Rahmen der unter Kapitel 2 dargestellten Zielsetzungen der Arbeit.

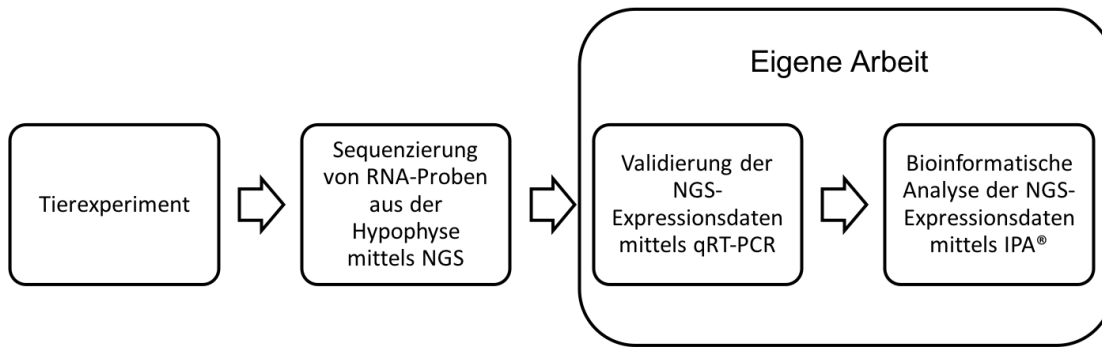


Abbildung 3: Studiendesign der vorliegenden Arbeit. Das Tierexperiment und die Sequenzierung der RNA-Proben der Hypophyse mittels NGS erfolgten in Vorarbeiten am FBN Dummerstorf. Anschließend wurden eine Validierung der NGS-Expressionsdaten sowie eine bioinformatische Analyse derer mittels IPA® durchgeführt. FBN = Forschungsinstitut für Nutztierbiologie, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, NGS = *next generation sequencing*, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion, RNA = Ribonukleinsäure

3.2.2 Tiere

Alle in-vivo-Experimente wurden nach nationalen und internationalen Richtlinien durchgeführt und vom internen institutionellen Prüfungsausschuss genehmigt. Es wurde entsprechend ein Tierversuchsantrag gestellt und behördlich genehmigt (LALLF 7221.3-1-014/17). Die Anforderungen entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz und der Tierschutz-Versuchstier Verordnung.

3.2.2.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen im spezifisch pathogen-freier Aufzucht in Makrolonkäfigen Typ II (EBECO, Castrop-Rauxel, Deutschland) in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten (Raumtemperatur = 22,5 °C; stündlicher Luftwechsel). Ab dem 21. Lebenstag waren die Böcke in Einzelkäfigen untergebracht. Die Käfigbesatzdichte entsprach den gesetzlichen Vorgaben der europäischen Versuchstierverordnung (Richtlinie 2010/63/EU). Frisches Leitungswasser und Futter nach fester Zusammensetzung standen *ad libitum* zur Verfügung (autoklaviertes Ssniff® M-Z Futter; Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Hygienemanagement und Gesundheitskontrollen erfolgten nach den Richtlinien von FELASA (Mahler Convenor et al., 2014).

3.2.2.2 Trainingsexperiment

Das Experiment wurde von April bis Juni 2017 mit männlichen Mäusen der DUHLB- und DUK-Linie (insgesamt 32 Mäuse) durchgeführt. Um Stoffwechselveränderungen bei körperlicher Aktivität zu

identifizieren, wurden die Hälfte der männlichen Mäuse beider Linien im Alter von 49 bis 70 Tagen einem moderaten Trainingsprogramm ausgesetzt. Hierfür sollten die Mäuse (n=8 pro Linie) drei Wochen lang (fünf Mal pro Woche) täglich 30 Minuten auf einem computergestützten Laufband (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) laufen. Das Trainingsprogramm ist in Tabelle 7 dargestellt. Da Mäuse der DUHLB-Linie in den vergangenen getesteten Generationen einen Submaximallauf für durchschnittlich 133 Minuten absolvierten, entspricht ein 30-minütiges Training 22,56% des Submaximallaufes. Um die Trainingsdauer für die lauschwächere DUK-Linie anzupassen, wurden 22,56% der Submaximallaufleistung der vorherigen Generationen berechnet. Dies entsprach einer Laufzeit von 14,89 Minuten. Die Anfangsgeschwindigkeit betrug 0,2 m/s für 160 s, wurde dann gesteigert auf 0,25 m/s für 1600 s (DUHLB) bzw. 700 s (DUK) am ersten Tag, mit anschließenden wöchentlichen Steigerungen auf 0,33 m/s und 0,42 m/s bis zu einer Endgeschwindigkeit von 0,5 m/s (DUHLB) bzw. 0,42 m/s (DUK). Als Kontrolle dienten männliche Tiere (n=8) beider Linien, die nicht trainiert und ausschließlich in Einzelkäfigen gehalten wurden.

Tabelle 7: Ablauf des Trainingsexperiments.

LT	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
	T	Pause	Training				Pause				Training				Pause				Training			

DUHLB- und DUK-Mäuse wurden im Alter von 49 bis 70 LT einem dreiwöchigen Training unterzogen. An Trainingstagen erfolgte ein 30-minütiges Laufbandtraining mit steigenden Geschwindigkeiten. Die Dauer des Trainings wurde für DUK-Mäuse entsprechend ihrer Laufkapazität auf 14,89 Minuten angepasst. - = bis, DUHLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, LT = Lebenstag, T = Training

3.2.2.3 Probengewinnung

Im Alter von 70 Tagen wurden die Tiere aller vier Gruppen, jeweils Mäuse beider Linien ohne und mit Training, durch Dekapitation per Scherenschnitt exekutiert. Für die Analysen wurden Blut- und Gewebeproben von Leber, Subkutanfett, Muskel sowie die Hypophyse entnommen. Die Gewebeproben wurden gewogen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff gefroren sowie anschließend bei -70 °C gelagert. Für die vorliegende Arbeit sind nur die Proben der Hypophyse relevant. Die Proben und Daten zu den anderen Organen bzw. zum Blut sind Gegenstand anderer aktueller Arbeiten der Forschungsgruppe von Privatdozent (PD) Dr. Höflich am FBN Dummerstorf.

3.2.3 RNA-Isolation

Aus den eingefrorenen Hypophysen wurde die RNA isoliert (vier Gruppen, je acht Tiere) und anschließend für die weitere Verarbeitung aufgereinigt.

Für die RNA-Isolation wurde die RNA mittels der Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi aus den Zellen der Gewebeproben extrahiert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Das Gewebe der Hypophyse wurde mit einem Reaktionsgemisch aus Phenol und Guanidin-Thiocyanat (TRIzol-Reagenz; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zur Zelllyse versetzt. Das verwendete Protokoll ist in der Supplementären Abbildung 1 aufgeführt. Im Gegensatz zu anderen Verfahren, liefert die Single-Step-Methode eine hohe Ausbeute sowie ein geringes Maß an Degradation der RNA, da durch die Zugabe

von Guanidin Ribonukleasen inhibiert werden. Es ist ein geeignetes Prinzip für die Extraktion von RNA für Genexpressionsanalysen, da viele Proben parallel isoliert werden können und das Verfahren ebenfalls für kleine Gewebemengen geeignet ist (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Im Anschluss an die Isolation erfolgte ein DNase-Verdau mittels DNase I (Baseline-Zero DNase; Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland), bei dem Spuren von DNA entfernt wurden. Die RNA-Aufreinigung wurde mittels Säulenkits (Zymo® RNA Clean & Concentrator; Zymo Research, Irvine, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Protokoll ist in der Supplementären Abbildung 2 aufgeführt. Die Spin-Säule besitzt eine semipermeable Membran, an welche die RNA mithilfe eines Puffers zunächst gebunden wurde. Durch Waschschrte wurden Verunreinigungen entfernt. Das Lösen der RNA von der Säule erfolgte anschließend durch Elution mit Wasser. Zur Langzeitlagerung wurde die RNA bei -70 °C eingefroren.

Die anschließende Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA wurde mithilfe des NanoDrop™ ND 1000 Mikrovolumen-Spektralphotometers (PqLab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Mittels einer Xenon-Blitzlichtlampe erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung von 1-2 µl Probe bei 260 nm. Die Konzentrationen der RNA-Proben befanden sich dabei im Bereich von 70 ng/µl bis 700 ng/µl. Das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm (260/280 Ratio) kann bei der Einschätzung der Reinheit der Proben helfen. Für RNA sollte diese bei 2 liegen (Glase, 1995). Proben, die diesen Wert deutlich unterschritten, wurden wiederholt mit dem RNA-Säulenkit (Zymo® RNA Clean & Concentrator, Zymo Research, Irvine, USA) aufgereinigt.

Die Integrität der RNA wurde anschließend über den Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) geprüft. Alle Proben, die eine RNA-Integrität (*RNA integrity number*, RIN) >8 (Schroeder et al., 2006) aufwiesen, wurden für die weitere Probenvorbereitung für die NGS-Analyse genutzt.

3.2.4 Umschreiben der RNA in cDNA und Generierung der cDNA-library

Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Proben für die NGS-Analyse (siehe 3.2.5). Zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung musste zunächst die aufgereinigte und fragmentierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Anschließend wurde eine cDNA-library erstellt. Dafür wurden an die beiden Enden der cDNA-Moleküle der einzelnen Proben spezifische Adapter angehängt. Zur Vervielfältigung wurde anschließend eine PCR durchgeführt. Die entstandene cDNA-library wurde dann für NGS genutzt. Das Umschreiben in cDNA sowie das Erstellen der cDNA-library erfolgte nach dem Illumina Low Sample Protokoll für das TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina, Berlin, Deutschland) nach Herstellerangaben. Für Inkubations- und Amplifikationsschritte wurde ein ThermoCycler (Conquer Scientific, San Diego, USA) verwendet. Eine schematische Darstellung des *workflows* ist in Abbildung 4 gegeben.

Die Qualitätskontrolle der cDNA-libraries erfolgte mit dem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer und dem Agilent DNA 1000 Chip Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Diese Methode eignet sich gut für die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten (Davies et al., 2016).

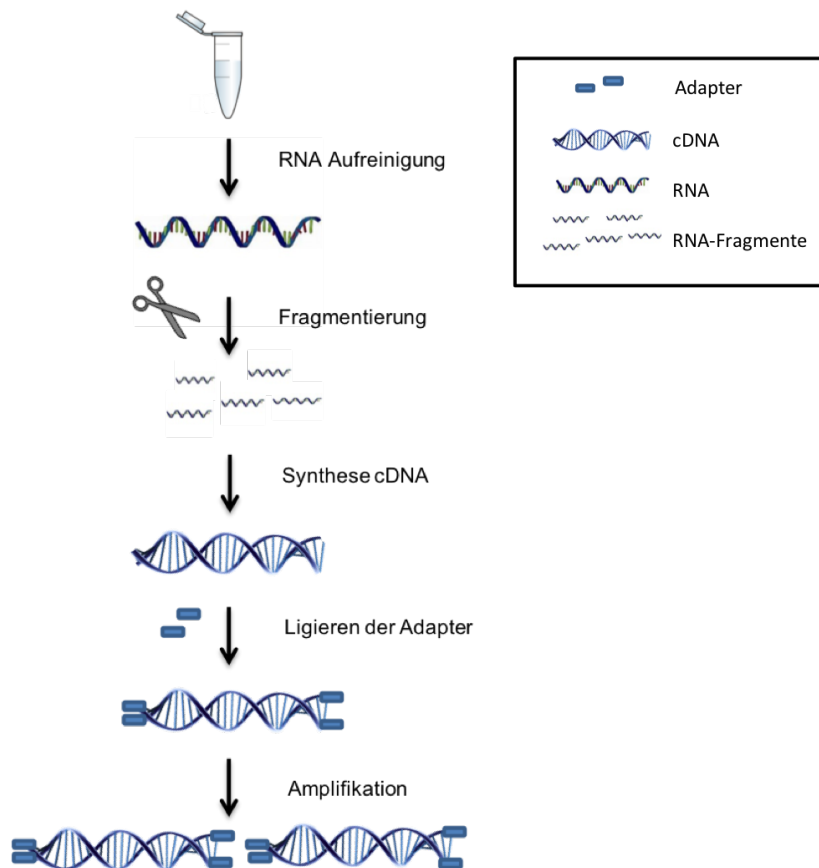


Abbildung 4: Probenvorbereitung für RNAseq. Schematische Darstellung des *workflows*, unterteilt in fünf Durchführungsschritte. Ausgangsprodukt war die isolierte und aufgereinigte RNA aus den Gewebeproben der Hypophyse der DUhLB- und DUK-Mäuse aus dem Tierexperiment. Endprodukt war die cDNA-*library* für die Durchführung von NGS. cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, RNA = Ribonukleinsäure, RNAseq = RNA-Sequenzierung

3.2.5 Sequenzierung mittels *next generation sequencing*

Zur Quantifizierung der cDNA-*library* Konzentration (siehe 3.2.4) wurde der KAPA qPCR *library* Quantification Kit (KAPA-Biosystems, Roche, Wilmington, USA) nach Herstellerangaben genutzt.

Die normalisierte, gepoolte cDNA-*library* wurde auf einer Durchflussszelle (cBot-System) klonal *geclustert* und auf einem HiSeq2500 (Illumina, Berlin, Deutschland) für 2x101 bp in der Sequenzierungsanlage im FBN Dummerstorf, Deutschland im High-Output-Modus sequenziert. Das Genom der Bakteriophagen PhiX wurde den Proben als interne Kontrolle zugesetzt.

Die Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten (*reads*, fastq-formatiert) erfolgte über das Programm FastQC (Version 0.11.5). Dabei wurden *reads* mit geringer Qualität, deren *Q-Score* <30 war oder deren Leselänge weniger als 30 bp betrug, aussortiert. Gleichzeitig wurden die Adapter-ähnlichen Sequenzen entfernt. Die qualitativ hochwertigen end-gepaarten *reads* wurden dann mit Hisat2 Version (2.1.0) (Pertea et al., 2016) gegen das Ensembl-Referenzgenom der Maus (GRCm38) gemappt. Die Anzahl der *reads*, die einem Gen eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden aus den Hisat2-Kartierungsergebnissen mit HTSeq (Version 0.8.0) extrahiert (Anders et al., 2015). Die

daraus resultierenden Daten bildeten die Grundlage zur Berechnung differentiell exprimierter Gentranskripte mit dem R-Paket edgeR (Version 3.20.1) (Robinson et al., 2010). Transkripte mit wenigen *reads* (*counts per million*, cpm) wurden herausgefiltert, um nur Transkripte mit >0,5 cpm in mindestens vier *libraries* zu erhalten.

Die so gebildeten Datentabellen wurden entsprechend der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ausgewertet. Die Datentabellen umfassten für jedes analysierte Tier (n=32, vier Gruppen mit je acht Tieren, siehe 3.2.2.2) ein Transkriptomprofil. Über eine zweidimensionale Darstellung des *biological coefficient of variation* (BCV) wurde überprüft, ob deutliche Ausreißer in den Transkriptomprofilen der einzelnen Tiere auftraten. Es wurden Mittelwerte gebildet und paarweise Vergleiche erstellt. Abbildung 5 stellt die Benennung der Vergleiche der Gruppen des Trainingsexperiments dar. Zum einen wurden Vergleiche erstellt, in denen jeweils die Daten der gelaufenen mit den Daten der nicht-gelaufenen Tiere einer Linie verglichen wurden: DUhLB_Laufband vs ohne Belastung (DUhLB_LB vs oB) und DUK_Laufband vs ohne Belastung (DUK_LB vs oB). Ergänzend dazu wurden Vergleiche erstellt, welche jeweils die Daten der gelaufenen bzw. nicht-gelaufenen Tiere der beiden Linien betrachteten: DUhLB vs DUK_ohne Belastung (DUhLB vs DUK_oB) und DUhLB vs DUK_Laufband (DUhLB vs DUK_LB). Im Sinne der Zielsetzung (siehe Kapitel 2) lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf den Vergleichen DUhLB vs DUK_oB, der die Assoziation zu hoher Ausdauerlaufleistung darstellte, und DUK_LB vs oB, der die Assoziation zum Training darstellte.

Für jedes gefilterte DEG wurde ein *mean* cpm-Wert (mcpm) aus den Daten bestimmt. Dieser gibt einen Mittelwert der cpm-Werte aus den 16 Proben an, die in die Berechnungen des jeweiligen Vergleichs eingehen. Außerdem wurde für jedes gemessene Transkript und jeden der vier Vergleiche der logarithmierte *fold change* (log2FC), der p-Wert (*p-value*) sowie die *false discovery rate* (FDR) berechnet. Unter dem FC versteht man das Verhältnis der Expressionswerte aus zwei Gruppen. Dieser Wert wurde in der vorliegenden Arbeit zur Betrachtung der Expressionsunterschiede in der Hypophyse der DUhLB- und Kontrollmäuse genutzt. Werte log2FC>0 gaben dabei eine erhöhte Expression an, Werte log2FC<0 eine verminderte Expression. Der p-Wert nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Er gibt an, wie wahrscheinlich es ist, dass ein Ergebnis zufällig entstanden ist. Je kleiner der p-Wert ist, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit für zufällig entstandene Ergebnisse. Die p-Wert-Berechnung erfolgte mit dem R-Paket edgeR anhand von linearen Modellen. Aus dem p-Wert wird die FDR (*q-value*) abgeleitet (Benjamini und Hochberg, 1995). Diese liefert statistisch einen genaueren Hinweis auf die zufällig entstandenen Ergebnisse und wurde daher in der vorliegenden Arbeit zur Betrachtung der signifikanten Expressionsunterschiede in der Hypophyse eingesetzt. In allen Analysen wurde die FDR als Signifikanzniveau auf 0,05 festgelegt.

Die auf Basis dieses Filterkriteriums identifizierten DEGs fanden bereits Eingang in die Publikation Walz et al. (2021). In dieser wurde überprüft, ob die Gene in Regionen kodiert werden, für die in der Literatur beschrieben wurde, dass sie mit Trainingserfolg assoziiert sind (Massett et al., 2009). Außerdem wurden die DEGs KEGG-Signalwegen (via <https://pathview.uncc.edu>) zugeordnet. In der hier vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Betrachtung der Geninteraktionen zwischen den DEGs, die mit der IPA®-Software ermittelt wurden (siehe 3.2.7), und der Betrachtung der Hypophysenachsen-assoziierten Hormone und Hormonrezeptoren (siehe 3.2.8). Zudem fand die Translation zur Situation beim Menschen Eingang in die vorliegende Arbeit.



Gruppe	Linie	Training	Vergleich
a) vs b)	DUhLB vs DUhLB	LB vs oB	DUhLB_LB vs oB
c) vs d)	DUK vs DUK	LB vs oB	DUK_LB vs oB
a) vs c)	DUhLB vs DUK	oB vs oB	DUhLB vs DUK_oB
b) vs d)	DUhLB vs DUK	LB vs LB	DUhLB vs DUK_LB

Abbildung 5: Benennung der Vergleiche der Mausgruppen. Tiere der Mauslinien DUhLB und DUK wurden entweder einem dreiwöchigen Training unterzogen (LB) oder nicht trainiert (oB) und wurden somit vier Gruppen a) - d) zugeordnet. Aus den individuellen NGS-Expressionswerten jeder Gruppe wurden für jedes Gentranskript Mittelwerte gebildet und paarweise Vergleiche zur Auswertung berechnet. Die Benennung der Vergleiche erfolgte nach Linie und Training. DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, LB = Laufband, n = Anzahl, oB = ohne Belastung, vs = versus

3.2.6 Validierung der NGS-Expressionsdaten mittels qRT-PCR

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Validierung mittels qRT-PCR im BioMark HD System von Fluidigm®. Diese Technologie erlaubt es, bis zu 48 Gentranskripte in bis zu 48 Proben gleichzeitig zu quantifizieren. Das diente der stichprobenartigen Prüfung der NGS-Daten und erfolgte mit Hilfe von Haushaltsgenen, die anhand des *m-values* ausgewählt wurden (siehe 3.2.6.5). Bei der Auswahl der DEGs zur Validierung wurde vor allem auf eine breite funktionelle Varianz der Transkripte, das heißt, die Transkripte sollten zu unterschiedlichen funktionellen Gruppen gehören, und auf starke Expressionsunterschiede geachtet. Zudem sollten die DEGs relevant für die Funktion der Hypophyse sein und wenn möglich sollten Expressionsunterschiede im Zusammenhang mit hoher Ausdauerleistung oder sportlicher Aktivität bekannt sein. Weiterhin erfolgte eine Zusammenstellung einzelner DEGs aus den Top 10 der am stärksten exprimierten Transkripte der zwei Vergleiche DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB.

3.2.6.1 Generierung und Auswahl der Primer

Für die 43 ausgewählten DEGs und fünf Haushaltsgene wurden im Internet Primer generiert, die für die Validierung der NGS-Daten mit der qRT-PCR genutzt wurden.

Um geeignete Primer-Sequenzen anhand der bekannten Gen-Sequenz zu ermitteln, können verschiedene Internetprogramme genutzt werden. Auf die Sequenz-Eigenschaften kann dabei, bspw. über Einstellung des Guanin/Cytosin-(GC)-Gehalts oder der Länge der Primer, Einfluss genommen werden. Für die anschließende Methode ist es notwendig, die Länge des Amplifikationsproduktes zu definieren. Die Generierung der Primerpaare für diese Arbeit erfolgte mithilfe des Internetprogramms Primer-BLAST. Das Einlesen der cDNA-Sequenz der Gene erfolgte über die Zugangsnummer (*accession number*) des jeweiligen Gens für Primer-BLAST. Diese wurden über die Internetplattformen des *national center for biotechnology information* (NCBI) und Ensembl® mithilfe des Gensymbols aus den NGS-Ergebnistabellen recherchiert. Bei der Generierung der Primerpaare via Primer-BLAST wurden die Standardeinstellungen des Programms weitgehend beibehalten. Die Produktlänge wurde über die Einstellung „*PCR product size*“ auf 120-200 Basen festgesetzt. Das Temperaturoptimum der Primer lag bei 60 °C mit einer zulässigen Differenz von +/-3 °C. Der Organismus wurde über die Einstellung „*Organism*“ auf *mus musculus* (Hausmaus) festgelegt.

Anschließend erfolgte die Auswahl der Primer aus den von Primer-BLAST generierten Primerpaaren. Die Auswahl erfolgte unter folgenden Kriterien: Produktlänge (optimal: 120-180 Basen), GC-Gehalt (optimal: > 60%), Temperatur (optimal: gleiche Temperatur der beiden Primer im Primerpaar), abwechslungsreiche Basenabfolge. Für einige Gene wurden außerdem weitere Primerpaare, deren Sequenzen aus Publikationen stammten, ausgewählt. Dies geschah im Rahmen einer Primertesting (siehe 3.2.6.4), da die zunächst ausgewählten Primer nicht funktionstüchtig waren.

Alle Primer (Tabelle 3) wurden über die Firma Sigma Aldrich® (München, Deutschland) bestellt. Die lyophilisierten Primer wurden in 1x TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5-8,0) gelöst, um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten. Die Lagerung der gelösten Primer erfolgte bei -20 °C.

3.2.6.2 Umschreiben der RNA in cDNA

Um die Expression von Transkripten zu quantifizieren, wird Einzelstrang-RNA mittels Reverser Transkriptase und einem Nukleotidmix in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase gehört zur Gruppe der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen. Sie benötigt Primer, um den RNA-Strang abzuschreiben. Dafür wurden *random*-Primer, die relativ kurz sind und sich zufällig an die RNA anlagern, und Oligo(dT)-Primer, welche aus mehreren Thymin-Basen bestehen und die mit dem Poly-A-Schwanz der RNA interagieren, genutzt. Es wurde das GoScript™ Reverse Transkription Kit (Promega Corporation, Madison, USA) zur Einzelstrang-cDNA-Synthese verwendet. Zwischenprodukte wurden im gesamten Experimentiervorlauf bei -20 °C gelagert.

Es wurde mit den zur Transkriptom-Sequenzierung genutzten RNA-Proben (siehe 3.2.3) gearbeitet. Ausgeschlossen wurde eine Probe, da hier das RNA-Material nicht mehr ausreichend vorhanden war. Dabei lagen die Proben in unterschiedlichen Konzentrationen (ng/µl) vor (Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop, Zusammenfassung der RNA-Konzentrationen in der Supplementären Tabelle 1). Es wurden einzelne Volumina der RNA-Proben entsprechend ihrer Konzentration entnommen und mit Nuklease-freiem Wasser bis zu einem Volumen von 4 µl aufgefüllt (RNA-Ansatz).

Als nächstes wurde ein Primer-Mix-Ansatz aus Oligo(dT)- und *random*-Primern (je 0,5 µg/µl) für alle Proben erstellt. 1 µl des Primer-Mix (zusammen 0,5 µg) wurde anschließend jeweils zu den RNA-Ansätzen hinzugegeben. Darauf folgend wurde das Gemisch (V=5 µl) für fünf Minuten bei 70 °C im ThermoCycler erhitzt und unmittelbar danach fünf Minuten auf Eis gelagert, bevor es für zehn Sekunden zentrifugiert wurde.

Anschließend wurden jeweils 15 µl des Mastermix-Ansatzes (Tabelle 8) zu jedem RNA-Ansatz gegeben. Folgend wurden die Proben zur cDNA-Synthese im ThermoCycler mit Deckelheizung nach folgendem Temperaturprofil inkubiert (5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C, 15 min bei 72 °C). Bei einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Probenansatz entsprachen die cDNA-Konzentrationen 12,5 ng/µl, 25 ng/µl, bzw. 50 ng/µl (RNA-Äquivalent). Eine Zusammenfassung der cDNA-Konzentrationen (RNA-Äquivalent) ist in der Supplementären Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 8: Mastermix-Ansatz zur cDNA-Synthese

Komponenten	Volumen für 1x Ansatz (µl)
GoScript™ 5x reaction buffer	4
MgCl ₂ (2,5 mM)	2
PCR Nucleotid Mix (0,5 mM je dNTP)	1
Recombinant RNasin® ribonuclease inhibitor 20 U	0,5
GoScript™ Reverse Transkriptase	1
Nuklease-freies Wasser	6,5

Komponenten und deren eingesetztes Volumen für einen 1x Ansatz. Pro RNA-Ansatz wurde 1x Mastermix-Ansatz pipettiert. µl = Mikroliter, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, dNTP = Nukleosidtriphosphat, MgCl₂ = Magnesiumchlorid, mM = Millimol

Zur weiteren Analyse wurde ein cDNA-Pool (c=25 ng/µl) aus den Probenansätzen der Konzentrationen 25 ng/µl und 50 ng/µl angefertigt. Aufgrund von zu geringer cDNA-Menge in den Proben mit c=12,5 ng/µl wurden diese Probenansätze nicht für das Anlegen des cDNA-Pools verwendet.

3.2.6.3 Anlegen der Verdünnungsreihe

Der cDNA-Pool mit der Ausgangskonzentration von 25 ng/µl (siehe 3.2.6.2) wurde genutzt, um eine Verdünnungsreihe zu erstellen. Mit dieser lassen sich die Effizienz und Spezifität der Primer in einer Primertestung abschätzen. Hierbei wurden je Primertest Konzentrationen zwischen 25 und 0,0025 ng/µl sowie eine Negativkontrolle ausgewählt.

Des Weiteren wurde für jedes Primerpaar ein Primermix, bestehend aus den zuvor gelösten jeweiligen *forward*- und *reverseprimern* (siehe 3.2.6.1), in einer Konzentration von 20 µM angefertigt.

3.2.6.4 LightCycler® qRT-PCR – Testen der Primerpaare

Zur Primertestung mittels qRT-PCR wurde der LightCycler® 480 (Roche, Indianapolis, USA) genutzt. Dabei wurde pro Primertest der jeweilige Primermix (siehe 3.2.6.3), in Kombination mit einem PCR-

Mastermix (2x SYBRTM *green*) sowie dem cDNA-Pool, in zweifacher Wiederholung mit verschiedenen Verdünnungsstufen (siehe 3.2.6.3) zur Testung auf einer 96-LightCycler-Well-Platte amplifiziert (PCR-Ansatz zur Primertestung, Tabelle 9). Das verwendete Temperaturprofil ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 9: PCR-Ansatz zur Primertestung

Komponenten	Volumen für 1x Ansatz (µl)
cDNA 25 ng/µl (und weitere)	1
Wasser ad 4,5 µl	3,5
Primermix 20 µM	0,5
2x SYBR TM <i>green</i> Mastermix	5

Komponenten und deren eingesetztes Volumen für einen 1x PCR-Ansatz zur Primertestung. Pro Primerpaar wurde ein PCR-Ansatz hergestellt. µl = Mikroliter, µM = Mikromol, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, ng = Nanogramm, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 10: LightCycler qRT-PCR Temperaturprofil

Programm	Temperatur (°C)	Zeit	Zykluszahl
Präinkubation	95	5 Minuten	1
Amplifikation	95	15 Sekunden	45
	60	10 Sekunden	
	72	10 Sekunden	
Schmelzkurve	95	10 Sekunden	1
	60	1 Minute	
	95	∞	
Kühlung	40	30 Sekunden	1

Temperaturen, deren Dauer und die Zyklusanzahl während der PCR zur Primertestung. C = Celsius, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Auswertung erfolgte die Darstellung der Amplifikations- und Standardkurve mit der Software LightCycler®480 (Version 1.5). Die Amplifikationskurve dient der Darstellung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom Zyklus der PCR. Das mit der Zykluszahl steigende Fluoreszenzsignal ist hierbei direkt proportional zur steigenden Kopienzahl der DNA während der Amplifikation, da der Farbstoff in die doppelsträngige DNA eingebaut wird. Der entscheidende, in der Kurve ablesbare Wert, ist der *cycle threshold* (Ct). An diesem Punkt steigt das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz (Heid et al., 1996). Dafür ist ungefähr eine Menge von 10⁸ (Wittwer et al., 1997) bis 10¹¹ (LightCycler Manual) der Ausgangskonzentration des *templates* nötig. Je größer die Ausgangskonzentration des *templates*, welches abgeschrieben werden soll und damit der DNA, desto eher wird der Ct erreicht (Smith und Osborn, 2009). Die Standardkurve wird zur absoluten Quantifizierung aus den Amplifikationskurven der einzelnen Verdünnungsschritte entwickelt. Es wird der Ct in Abhängigkeit vom log der Konzentration (logc) der Verdünnungsstufen der DNA aufgetragen (Abbildung 6). Anhand der Standardkurve soll die inverse Proportionalität zwischen beiden Größen, einhergehend mit einer regelmäßigen Amplifikation aufgezeigt werden. Aus der Grafik können Achsenabschnitt und Anstieg bestimmt werden. Aus dem Anstieg a, der als Maß für die Kinetik der PCR dient, wird die Effizienz E berechnet ($E=10^{-1/\text{Anstieg } a}$), die unter optimalen Bedingungen E=2 betragen sollte, da pro PCR-Zyklus theoretisch eine Verdopplung der Amplifikate stattfindet. Für eine Effizienz E=2 beträgt der Anstieg a=-3,3. Zudem wird der Standardfehler der Regression betrachtet, welcher anzeigt, wie gut die einzelnen Punkte der Standardreihe auf der Regressionsgeraden liegen. Primerpaare, für die keine Amplifikation nachgewiesen werden konnte, bzw. die PCR-Effizienz <1,7 oder >2,2 oder der Fehler >0,2 war, wurden nicht für die Validierung mittels qRT-PCR verwendet

(LightCycler® 480 Instrument, Operator's Manual, Software Version 1.5, Version 3.0, February 2008, Roche, Indianapolis, USA).

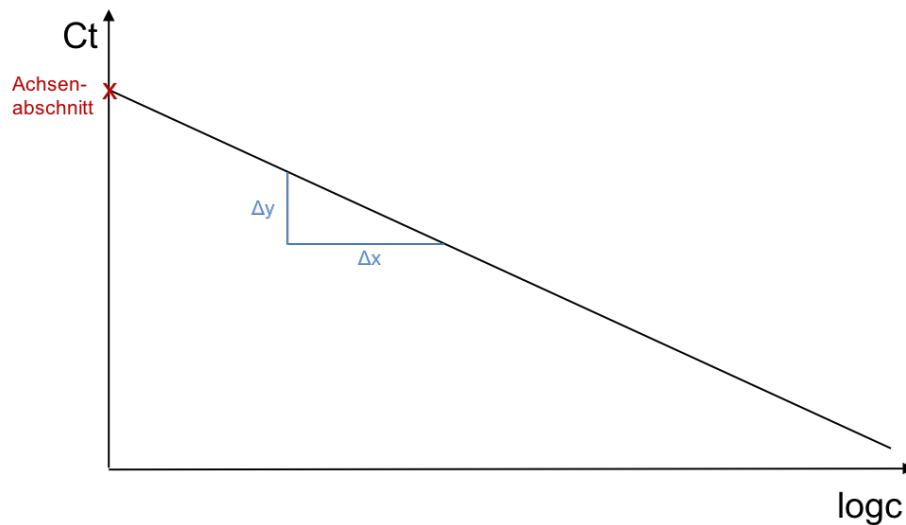


Abbildung 6: Standardkurve. Exemplarische Darstellung der Abhängigkeit des Ct (y-Achse) vom logc der Proben (x-Achse). Der lineare Verlauf der Standardkurve kann als inverse Proportionalität zwischen Ct und logc interpretiert werden, was auf eine regelmäßige Amplifikation von DNA-Molekülen in der PCR hindeutet. Aus der Grafik können Achsenabschnitt und Anstieg $a = \Delta y / \Delta x$ bestimmt werden. Ct = *cycle threshold*, DNA = Desoxyribonukleinsäure, logc = Logarithmus der Konzentration, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

3.2.6.5 qRT-PCR im BioMark HD System

Die Durchführung der qRT-PCR zur Validierung der NGS-Daten erfolgte nach dem BioMark HD User Guide Protokoll für die qRT-PCR mittels des BioMark HD Systems (Fluidigm®, San Francisco, USA).

Mittels der integrierten strömungstechnischen Schaltung (*integrated fluidic circuit*, IFC) auf einem Micro-Array-Chip können im BioMark HD System mehrere Proben mit mehreren *assays* in einer kombinierten qRT-PCR interagieren. Auf dem Chip existieren verschiedene Kammern und Kanäle. Durch die Variation der Einstellung der Einzelkomponenten auf dem Chip, ist es möglich, dass jeder Probenansatz mit jedem *assay*-Ansatz (enthält Primer) interagiert. Es können verschiedene Plattenformate verwendet werden. Hier wurde das 48x48 Format genutzt. In vier Arbeitsschritten laufen Präamplifikation, *priming* und Laden der Platte sowie die eigentliche PCR ab.

Die Amplifikation erfolgte in der 48x48-Dynamic-Array-IFC-Platte mit dem EvaGreen® Farbstoff. Neben 48 Primerpaaren in *assay*-Ansätzen erfolgte der Einsatz von 31 cDNA-Proben sowie zwei Standard-Verdünnungsreihen je sieben Stufen und drei Wasser-Proben.

Für die Präamplifikationsreaktion (*specific target amplification*, STA-Reaktion), in welcher die Ziel-cDNA vervielfältigt wird, wurden die Proben (siehe 3.2.6.2) auf 25 ng/μl verdünnt. Aus einem Pool aller Proben wurde zudem die Standard-Verdünnungsreihe erstellt, die sieben Konzentrationen zwischen 25 ng/μl und 0,025 ng/μl umfasste. Der Primermix für die STA-Reaktion bestand aus allen Primerpaaren, die aus der 100 μM-Lösung (siehe 3.2.6.1) auf eine Konzentration von 500 nM verdünnt worden waren. Der Reaktionsansatz für die STA-Reaktion ist in Tabelle 11 abgebildet.

Tabelle 11: Mastermix für die STA-Reaktion

Komponenten	Volumen (µl) pro Reaktion
2x TaqMan PreAmp Mastermix	2,5
500 nM Primermix	0,5
Wasser	1
cDNA (25ng/µl bzw. andere Konzentration bei Verdünnungsreihe)	1

Komponenten und deren eingesetztes Volumen für eine STA-Reaktion. Für alle 31 cDNA-Proben sowie die zwei Standard-Verdünnungsreihen wurde jeweils eine STA-Reaktion durchgeführt. µl = Mikroliter, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, ng = Nanogramm, nM = Nanomol, STA = *specific target amplification*

Die STA-Reaktion erfolgte im ThermoCycler nach dem folgenden Temperaturprofil:

95 °C	10 min	} 14 Zyklen
95 °C	15 s	
60 °C	4 min	
4 °C	halten	

Im nächsten Schritt wurden mithilfe der Exonuklease nicht-inkorporierte Primer entfernt. Der Ansatz erfolgte wie in Tabelle 12 beschrieben. Pro STA-bearbeitetem 5 µl-Probenansatz wurden 2 µl pipettiert.

Tabelle 12: Ansatz für die Exonuklease-Reaktion

Komponenten	Volumen (µl) pro 5 µl-STA-bearbeitetem Ansatz
Wasser	1,4
Exonuklease I Reaktionspuffer	0,2
Exonuklease I (20 units/µl)	0,4

Komponenten und deren eingesetztes Volumen pro STA-bearbeitetem Ansatz (siehe Tabelle 11). µl = Mikroliter, STA = *specific target amplification*

Die Exonuklease-Reaktion erfolgte im ThermoCycler nach dem folgenden Schema:

37 °C	30 min
80 °C	15 min
4 °C	halten

Anschließend erfolgte die finale, fünffach-Verdünnung der DNA mit 18 µl TE-Puffer.

Für das Priming der 48x48-IFC-Platte wurde das Kontrolllinien-Fluid in den Akkumulator appliziert und der Chip im IFC controller MX® im Prime-Modus (113x) vorbereitet.

Nachfolgend wurde der Mastermix für die *assay*-Ansätze der Primer hergestellt (Tabelle 13). Pro Ansatz wurden 4,5 µl des Mastermix aus Ladungs-Reagenz und DNA-*suspension* Puffer sowie 0,5 µl des Primermix (25 µM aus 100 µM-Stocks (siehe 3.2.6.1) mit DNA-*suspension* Puffer (TE mit 0,1 mM EDTA)) zusammenpipettiert.

Zur Vorbereitung der Probenansätze für die qRT-PCR (Tabelle 14) wurden jeweils 2,75 µl des Mastermix aus Farbstoff und Ladungsreagenz sowie 2,25 µl der STA- und Exonuklease- behandelten cDNA-Proben pipettiert.

Tabelle 13: Assay-Ansatz für qRT-PCR

Komponenten	Volumen (µl) pro 1x Ansatz
2x assay loading reagent	2,5
1x DNA-suspension Puffer	2,0
Primermix (25 µM pro forward und reverse)	0,5

Komponenten und deren eingesetztes Volumen pro 1x-Ansatz für jeweils 48 Primerpaare. µl = Mikroliter, µM = Mikromol, DNA = Desoxyribonukleinsäure, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 14: Probenansatz für qRT-PCR

Komponenten	Volumen (µl) pro 1x Ansatz
2x SsoFast EvaGreen® Supermix with low ROX	2,5
20x DNA-binding dye sample loading reagent	0,25
cDNA-Probe	2,25

Komponenten und deren eingesetztes Volumen pro 1x-Ansatz für die STA- (Tabelle 11) und Exonuklease- (Tabelle 12) behandelten Proben sowie drei Wasserproben. µl = Mikroliter, cDNA = komplementäre DNA, DNA = Desoxyribonukleinsäure, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Im Anschluss konnten auf die geprimte Platte die *assay*- und Probenansätze aufgetragen werden. Pro Inlet der Platte wurden dabei 5 µl Primer (Tabelle 13) bzw. Probe (Tabelle 14) pipettiert. Abschließend erfolgte das Laden der Platte im *kontroller* im Load-Mix-Modus (113x).

Nachfolgend fand die Amplifikation im BioMark HD System statt. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: qRT-PCR Temperaturprofil

Programm	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zykluszahl
Hot Start	95	60	1
Amplifikation	96	5	30
	60	20	
Schmelzkurve	60	3	1
	60-95	1°C/3s	

Temperaturen, deren Dauer und Zyklusanzahl während der PCR zur Validierung der NGS-Expressionsdaten. C = Celsius, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion, s = Sekunden

Die Berechnung der Ct-Werte erfolgte mithilfe des Programms Fluidigm Real-Time PCR Analysis. Diese wurden anschließend exportiert. Für die Normalisierung und Berechnung der relativen Expression wurden die Daten in das Programm Data Analysis Gene Expression (DAG Expression, Ballester et al., 2013) importiert. Dabei wurde für jedes Amplifikat die Expression der Einzelproben relativ zur Standardreihe berechnet (25 ng/µl entsprach dabei einer relativen Expression von 1) und mithilfe der analysierten Haushaltsgene (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), Saures Ribosomales 60S-Protein P2 (RPLP2), Phosphoglyzeratkinase 1 (PGK1v1)) normalisiert. Die Auswahl der Haushaltsgene erfolgte anhand des *gene-stability measure (m-value)*. Dieser ist ein Maß für die durchschnittliche, paarweise Varianz eines Haushaltsgens mit den anderen Haushaltsgenen (Vandesompele et al., 2002). Der geringste *m-value* gibt dabei das Gen mit der stabilsten Expression an (Ballester et al., 2013, Vandesompele et al., 2002). Ausreißer wurden mit der ROUT-Methode identifiziert (Q= 0,1%) und entfernt. Um die in der qRT-PCR ermittelten Genexpressionswerte mit denen aus dem NGS zu vergleichen, wurden die Proben entsprechend der vier Gruppen aus dem Trainingsexperiment geordnet und aus den individuellen Daten jeder Gruppe Mittelwerte gebildet,

paarweise Vergleiche entsprechend den Vergleichen auf Basis der NGS-Daten (siehe 3.2.5) erstellt und log2FC für jedes Gen berechnet.

Zur Berechnung der Signifikanz der Expressionsunterschiede wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests mit nachfolgender Korrektur nach Bonferroni durchgeführt (Bland und Altman, 1995). Die Expressionsunterschiede galten als signifikant, wenn der p-Wert $<0,05$ war. Das Erstellen einer Regressionsgeraden zur Korrelation der Expression zwischen den beiden Messverfahren (NGS und qRT-PCR) sowie die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes R^2 erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 8.4.2). Aus dem Bestimmtheitsmaß R^2 wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient über $\sqrt{R^2}$ ermittelt.

3.2.7 Funktionelle Analyse von Genfunktionen und -interaktionen mit Ingenuity® Pathway Analysis

Die Funktionelle Analyse von Genfunktionen und -interaktionen der DEGs in der Hypophyse anhand der Daten aus dem NGS (siehe 3.2.5) erfolgte mittels IPA® (Qiagen, USA). IPA® ermöglicht den Aufbau von Geninteraktionsnetzwerken zur Darstellung biologischer Systeme (Krämer et al., 2014). Eine Genehmigung der Verwendung der Darstellungen von IPA® im Rahmen von Veröffentlichungen liegt vor (siehe Supplementäre Abbildung 3). Die bioinformatische Interpretation der DEGs in der vorliegenden Arbeit erfolgte mithilfe der *core*-Analyse von IPA® im November 2018. Die *core*-Analyse identifiziert die für einen Datensatz relevanten *pathways*, Geninteraktionsnetzwerke, *upstream* Regulatoren und biologischen Funktionen. Während in den *pathway*-Analysen den Signalwegen DEGs zugeordnet werden, werden diese in den Netzwerken nochmal unter Berücksichtigung anderer funktioneller und regulatorischer Informationen unabhängig vom Signalweg geordnet und damit weitere Geninteraktionen aufgezeigt. In der *upstream* Regulatoren-Analyse werden Vorhersagen zu *upstream*-Regulatoren von DEGs gemacht.

Zur *core*-Analyse wurden die Ergebnisse der Analyse auf differentielle Expression (siehe 3.2.5) auf signifikante Genexpressionsunterschiede auf Transkriptomebene in der Hypophyse gefiltert und zunächst mithilfe der *comparison*-Funktion, welche die Vergleiche (siehe 3.2.5, Abbildung 5) hinsichtlich der Anzahl an DEGs gegenüberstellt, analysiert. Anschließend erfolgte die Durchführung von Geninteraktionsnetzwerk-Analysen. Für die Erstellung der Geninteraktionsnetzwerke wurde die Standardeinstellung des Programms genutzt. Die Netzwerke wurden anhand eines IPA®-scores, der einer *p-value*-Berechnung mittels des einseitigen, exakten Fisher's Tests folgt und ein Maß für die Anzahl der mit dem Netzwerk assoziierten Moleküle darstellt, absteigend geordnet. Die Maximalzahl der pro Netzwerk dargestellten Moleküle wurde auf 35 limitiert. Zudem wurden den Netzwerken jeweils drei Top Krankheiten und Funktionen zugeordnet. Es wurde eine Auswahl an Geninteraktionsnetzwerken für die Dateninterpretation getroffen. Kriterien für die Auswahl waren neben hoher Signifikanz (IPA®-score >20) und starker differentieller Expression der DEGs (deutliche Färbung in den Abbildungen) auch funktionelle Zusammenhänge (DEGs mit neuronaler, metabolischer oder trainingsassoziierter Funktion) und eine Expressionsänderung von DEGs, die einer funktionellen Gruppe zugeordnet werden können.

Der Fokus der IPA®-Analysen lag auf der Analyse der Daten der Vergleiche DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB. Diese zeigen die Expressionsunterschiede in der Hypophyse von selektierten DUhLB-

Mäusen im Vergleich zu Kontrollen sowie in trainierten Kontrollmäusen im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen. Diese Vergleiche wurden ausgewählt, um die NGS-Daten entsprechend der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit auszuwerten (siehe Kapitel 2). Zur vergleichenden Betrachtung wurde die *overlay*-Funktion von IPA® genutzt. Mithilfe dieser Funktion können Geninteraktionsnetzwerke von Vergleichen mit unterschiedlichen Expressionsdaten überlappend visualisiert werden. Ein mit IPA® ermitteltes Geninteraktionsnetzwerk des einen Vergleichs diene als Basis, um die Expressionsunterschiede in dem anderen Vergleich im gleichen Stoffwechselweg zu beleuchten.

3.2.8 Genauswahl zur funktionellen Interpretation

Es wurden exemplarisch Gene aus den Geninteraktionsnetzwerk-Analysen zur funktionellen Interpretation der Expressionsdaten und Einordnung derer in den biologischen Kontext ausgewählt. Diese exemplarisch ausgewählten Gene werden als Schlüsselgene bezeichnet, da sie mögliche Anpassungen an hohes Ausdauerleistungsvermögen bzw. Training in der Hypophyse der DUhLB- und Kontrollmäuse aufzeigen könnten. Es wurden möglichst DEGs ausgewählt, die in den beiden Vergleichen DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB höher (bzw. niedriger) exprimiert waren und für welche die Daten nahelegen, dass die Selektion oder das Laufbandtraining eine Hochregulation (bzw. Herunterregulation) der Expression in der Hypophyse bewirken. Zudem wurde auf eine signifikante ($FDR < 0,05$) und starke ($\log_2FC > 1$ oder < -1) differentielle Expression der Gene geachtet. Die ausgewählten DEGs wurden in Microsoft Excel 2018 (Version 16.16.24) zusammengefasst und die Expressionsunterschiede (\log_2FC) grafisch in Balkendiagrammen visualisiert.

Über Literaturrecherche mittels PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden anschließend weitere Gene gesucht, die mit den Hormonachsen der Hypophyse, welche unter körperlicher Aktivität lipolytisch wirken (ACTH, GH, OXT, siehe 1.2.3), assoziiert sind. Diesbezüglich wurde unter den Schlagwörtern „*pituitary AND endurance AND (acth OR growth hormone OR oxytocin)*“ nach Genen gesucht, die in den Aktivierungs- und Sekretionsprozess der Hormone in der Hypophyse involviert sind. Abschließend erfolgte die Zusammenstellung der Gene in Microsoft Excel 2018. Zu den jeweiligen Genen wurden die NGS-Expressionswerte auf Transkriptomebene in der Hypophyse von DUhLB- und Kontrollmäusen herausgesucht und die mcpm-Werte (siehe 3.2.5) berechnet.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Unterschiede betrachtet, die ein Laufbandtraining auf das Transkriptom der Hypophyse von Mäusen bewirkt. Im Speziellen wurde analysiert, ob eine Langzeitselektion nach hoher Laufleistung zu ähnlichen Expressionsunterschieden im Transkriptom führt, wie ein dreiwöchiges Laufbandtraining bei nicht-selektierten Kontrollen. Hierzu wurde eine RNA-Sequenzierung mittels NGS durchgeführt und die Expression von Transkripten vergleichend betrachtet. Die Daten wurden mittels qRT-PCR validiert und anschließend die Funktionen und Interaktionen von DEGs ausgewertet. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

4.1 Qualitätskontrolle der NGS-Daten

Die Sequenzierung mittels NGS wurde von Herrn Dr. Nares Trakooljul und Mitarbeitern durchgeführt (siehe 3.2.5). Es wurden RNA-Proben der Hypophyse von 32 Mäusen genutzt. Zur Kontrolle der RNA-Integrität wurden nur Proben mit einer RIN>8 verwendet (siehe 3.2.3). Mittels NGS konnten in DUHLB-Mäusen 246 Millionen *reads* und in DUK-Mäusen 314 Millionen *reads* erzeugt werden. Pro *run* wurden dabei zwischen acht und 22 Millionen *reads* gelesen. Etwa 96% der *reads* konnten erfolgreich gegen das Mausreferenzgenom (GRCm38) gemappt werden. Es wurden allerdings nur die gemappten *reads* ausgewählt, die mit exonischen Regionen übereinstimmten, was ca. 88% ausmachte. Die Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten erfolgte über das Programm FastQC®, welches *reads* mit einem Q-Score <30 oder einer Leselänge weniger als 30 bp aussortierte. Außerdem wurden Transkripte mit wenigen *reads*, die cpm>0,5 in mindestens vier *libraries* nicht erreichten, herausgefiltert. Die anschließende Dimensionsreduktionsdarstellung des gesamten NGS-Datensatzes (Abbildung 7) über das R-Paket edgeR zeigte eine homogene Verteilung der Transkriptomdatensätze aller 32 Tiere. Deutliche Ausreißer konnten nicht gefunden werden. Somit konnten die Transkriptomdatensätze aller Tiere in die weitere Auswertung der NGS-Daten einbezogen werden. Die Punktwolken in Abbildung 7 zeigten aber deutliche Unterschiede zwischen den Transkriptomprofilen der Hypophysen der Mäuse der beiden Linien. Dahingegen ergab das Training jeweils keinen auffälligen Unterschied.

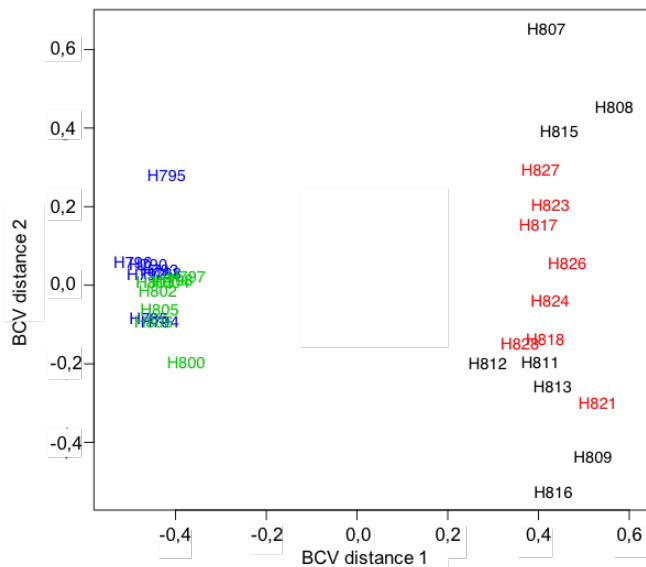


Abbildung 7: Dimensionsreduktion des gesamten NGS-Datensatzes der Hypophyse. Zweidimensionale Darstellung des BCV. Ein Punkt, bestehend aus einer Buchstaben-Zahlen-Kombination, entspricht einem Transkriptomdatensatz der Hypophyse eines Tieres. Die Datensätze der Tiere einer Gruppe aus dem Trainingsexperiment sind jeweils in den gleichen Farben gekennzeichnet (blau: DUhLB_LB, grün: DUhLB_oB, rot: DUK_LB, schwarz: DUK_oB). Aufgrund der homogenen Verteilung der Datenpunkte konnten die Transkriptomdatensätze von 32 Tieren in die weitere Auswertung einbezogen werden. Die Punktwolken zeigten aber deutliche Unterschiede zwischen den Transkriptomdatensätzen der Mäuse der beiden Linien, während das Training jeweils keinen auffälligen Unterschied ergab. BCV = *biological coefficient of variation*, DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, LB = Laufband, NGS = *next generation sequencing*, oB = ohne Belastung

4.2 Genexpressionsunterschiede im Transkriptomprofil der Hypophyse trainierter und untrainierter DUhLB- und Kontrollmäuse

4.2.1 Anzahl der differentiell exprimierten Gentranskripte

Mittels Sequenzierung über NGS konnte die Expression von 17.429 verschiedenen Genen in der Hypophyse bestimmt werden. Alle 32 Transkriptomdatensätze der Hypophyse der Mäuse aus den vier Experimentiergruppen (n = acht Mäuse pro Gruppe) wurden in den NGS-Analysen vergleichend betrachtet (siehe 3.2.5). Es wurden zum einen die Daten zu gelaufenen bzw. nicht-gelaufenen Mäusen beider Linien vergleichend betrachtet (Linienvergleiche, DUhLB vs DUK_LB bzw. oB), zum anderen wurde analysiert, wie sich die Transkriptexpression in der Hypophyse von Mäusen der jeweiligen Linie durch ein dreiwöchiges Training im Vergleich zu nicht-trainierten Tieren unterscheidet (Trainingsvergleiche, DUhLB_LB vs oB bzw. DUK_LB vs oB). Durch die Festsetzung des Signifikanzniveaus der FDR auf 0,05 limitierten sich die anschließenden Analysen auf die DEGs, deren Expressionsunterschiede als signifikant angesehen werden konnten (Tabelle 16, linke Spalte). Die Anzahlen der erhöht bzw. erniedrigt exprimierten DEGs waren dabei nahezu ausgeglichen.

Die meisten Unterschiede in der Expression auf Transkriptomebene konnten für den Linienvergleich der Mäuse aus DUhLB vs DUK aufgezeigt werden. Bei den untrainierten Tieren (DUhLB vs DUK_oB) konnten 1732 DEGs gefunden werden. Nach dem dreiwöchigen Training (DUhLB vs DUK_LB) wurden 3828 DEGs ermittelt, die höchste Anzahl in allen vier Vergleichen. Während ohne Training (DUhLB vs

DUK_oB) die Anzahl an erhöht und erniedrigt exprimierten DEGs ausgeglichen war, war nach Belastung (DUhLB vs DUK_LB) ein größerer Anteil an DEGs niedriger exprimiert (2211 von 3828 DEGs, entspricht 58%). Die Unterschiede im Transkriptom der Mäuse der DUhLB-Linie nach dem Training (DUhLB_LB vs oB) waren die geringsten, da hier nur 50 DEGs bestimmt wurden. Von diesen 50 DEGs zeigten 38 DEGs im Vergleich DUhLB_LB vs oB eine erhöhte Expression (75%). Bei Mäusen der Kontrolllinie DUK (DUK_LB vs oB) lag die Anzahl der Expressionsunterschiede nach dem Training um das zehnfache höher als bei Mäusen der selektierten DUhLB-Linie (637 zu 50 DEGs). Das Verhältnis von erhöht zu erniedrigt exprimierten DEGs war dabei im Vergleich DUK_LB vs oB ungefähr 2:1 (428 zu 209 DEGs).

Des Weiteren wurden die Expressionsdaten nicht nur unter Einschränkung der Signifikanz, sondern auch unter Einbeziehung des FC betrachtet, welcher bei einem $\log_2FC > 1 / < -1$ Expressionsunterschiede um den Faktor 2 angibt (Tabelle 16, rechte Spalte). Unter der gewählten Stringenz ($\log_2FC > 1 / < -1$ und $FDR < 0,05$) konnten im Vergleich der Tiere beider Linien ohne Training (DUhLB vs DUK_oB) 598 DEGs gefunden werden, nach dem Training (DUhLB vs DUK_LB) waren es 677 DEGs. Die Anzahl der erhöht und erniedrigt exprimierten DEGs war ausgeglichen (DUhLB vs DUK_oB: 316 zu 282 und LB: 322 zu 355). Bei Mäusen der DUhLB-Linie (DUhLB_LB vs oB) konnten die wenigsten Unterschiede gemessen werden (20 DEGs), während bei Mäusen der Kontrolllinie (DUK_LB vs oB) deutlich mehr Expressionsunterschiede aufgezeigt wurden (127 DEGs). Die zusätzliche Einschränkung des FC zeigte somit ähnliche Anteilsverteilungen der Anzahl der DEGs wie eine alleinige Einschränkung der FDR.

Tabelle 16: Anzahl DEGs in der Hypophyse im Vergleich der vier Mausgruppen

Vergleich	Anzahl DEGs ($FDR < 0,05$)			Anzahl DEGs ($FDR < 0,05$; $\log_2FC > 1 / < -1$)		
DUhLB vs DUK_oB	1732	890	842	598	316	282
DUhLB vs DUK_LB	3828	1617	2211	677	322	355
DUhLB_LB vs oB	50	38	12	20	14	6
DUK_LB vs oB	637	428	209	127	79	48

Anzahl der DEGs in der Hypophyse von DUhLB- und DUK-Mäusen, dargestellt für die vier Vergleiche. Abgebildet wurden dabei die Anzahl der DEGs mit $FDR < 0,05$ sowie mit $FDR < 0,05$ und $\log_2FC > 1 / < -1$. Schwarze Zahlen zeigen die Gesamtanzahl an DEGs, rote Zahlen entsprechen erhöht exprimierten ($\log_2FC > 0$), grüne erniedrigt exprimierten ($\log_2FC < 0$) DEGs. Fettgedruckt sind die beiden Vergleiche mit deren Daten eine Beschäftigung in der funktionellen Analyse mittels IPA® (siehe 4.4) erfolgte. DEG = differentiell exprimiertes Gentranskript, DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, FDR = *false discovery rate*, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung

4.2.2 Genexpressionsunterschiede, die in untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten Kontrollmäusen quantifiziert werden konnten

Gegenstand der Analysen in dieser Arbeit waren im Sinne der Zielsetzung (siehe Kapitel 2) die Expressionsunterschiede zweier Vergleiche: DUhLB vs DUK_oB, welcher die genregulatorischen Anpassungen in der Hypophyse infolge der Selektion auf hohe Laufleistung in DUhLB-Mäusen und somit Assoziationen zu hohem Ausdauerleistungsvermögen darstellt sowie DUK_LB vs oB, welcher Expressionsunterschiede im Transkriptom von Mäusen der Kontrolllinie in Assoziation zu einem dreiwöchigen Training aufzeigt.

Mithilfe der *comparison*-Funktion von IPA® konnte ein Venn-Diagramm erstellt werden (Abbildung 8), welches die DEGs abbildet, die sowohl in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB) als auch in der Hypophyse trainierter DUK-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB), quantifiziert werden konnten. In Assoziation zu hohem Ausdauerleistungsvermögen (DUhLB vs DUK_oB) konnten 1732 DEGs bestimmt werden und damit fast die dreifache Menge der DEGs aus den Daten zu den gelaufenen im Vergleich zu nicht-gelaufenen DUK-Mäuse, die mit dem Training assoziiert waren (DUK_LB vs oB, 633 DEGs). In der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse konnten demnach deutlich mehr Expressionsunterschiede gemessen werden, als in der Hypophyse trainierter DUK-Kontrollmäuse. 120 DEGs konnten überlappend sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, quantifiziert werden. Die DEGs werden symbolisiert durch die Schnittmenge der Kreise in Abbildung 8. Dies machte ca. 7% der gemessenen Expressionsunterschiede in der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen aus. Von den 120 DEGs waren 48 Gene sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen höher exprimiert. 65 Gene waren in beiden Vergleichen niedriger exprimiert. Die Schnittmenge wurde zu detaillierten Betrachtungen in der Analyse von Geninteraktionsnetzwerken genutzt (siehe 4.4), da sie selektionsspezifische Anpassungen in der Hypophyse der Mäuse der DUhLB-Linie widerspiegeln könnte, die für das bessere Verständnis des Energiestoffwechsels der DUhLB-Mäuse von Bedeutung sind.

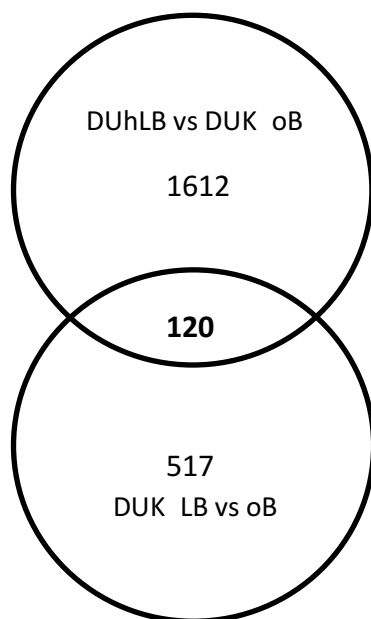


Abbildung 8: Genexpressionsunterschiede, die DUhLB-Mäuse ohne Training charakterisieren und die in der Hypophyse von Kontrollmäusen mit Training assoziiert werden konnten. Venndiagramm (adaptiert von Abbildung aus IPA®), welches die zwei Vergleiche DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB hinsichtlich der jeweiligen DEGs in der Hypophyse vergleicht. Die beiden Kreise stehen dabei jeweils für einen Vergleich. DEGs: DUhLB vs DUK_oB: 1732 DEGs, DUK_LB vs oB: 633 DEGs. Es konnten 120 Gene gefunden werden, die sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen differenziell exprimiert waren. Damit können diese Gene sowohl mit einem hohem Ausdauertrainingsvermögen als auch mit Training assoziiert werden. Die Gene werden symbolisiert durch die Schnittmenge der Kreise. Das Signifikanzniveau lag bei FDR = 0,05. DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DEG = differenziell exprimiertes Gentranskript, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FDR = *false discovery rate*, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung

Die mengenmäßig häufigsten Expressionsunterschiede innerhalb der 120 Gene lagen bei DEGs, die funktionell Strukturproteinen zugeordnet werden können (Anzahl: 18; entspricht 15%), gefolgt von Transportern (13; 11%), davon hauptsächlich *solute carrier* (SLC)-Transporter (11; 9%), und Regulatoren (13; 11%). Außerdem waren Enzyme, Rezeptoren, Signaltransduktionsproteine, am Stoffwechsel beteiligte Proteine und Transkriptionsfaktoren differentiell exprimiert (nach Reihenfolge 11, 11, 7, 7, 6; 9%, 9%, 6%, 6%, 5%). Weitere funktionelle Gruppen konnten mit Anteilen von jeweils <5% gefunden werden. Expressionsunterschiede von Genen, die funktionell zu lipolytisch-wirkenden Hypophysen-Achsen zugeordnet werden können, werden in Kapitel 4.4.3 vorgestellt.

Eine genauere Beschäftigung erfolgte mit den Genexpressionsdaten zu SLC-kodierenden Genen, da diese eine große funktionelle Gruppe innerhalb der 120 Gene darstellen, die sowohl mit hohem Ausdauerleistungsvermögen als auch mit Training assoziiert werden konnten. Die Genexpressionsunterschiede für ausgewählte SLC-kodierende Gene sind in Tabelle 17 dargestellt. Von den dargestellten Genen konnten 14 Gene mit hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert werden. Während 13 Gene niedrigere RNA-Level in der Hypophyse untrainierter DUHLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen zeigten, war lediglich SLC2A3 in der Hypophyse dieser Mäuse höher exprimiert. Bei SLC27A1, SLC27A4 und SLC32A1 konnten keine differentielle Expression in der Hypophyse von DUHLB-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen gemessen werden. In der Hypophyse trainierter im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen konnten für elf Gene niedrigere RNA-Level quantifiziert werden. Auch in diesem Vergleich war außerdem ein Gen (SLCO2A1) höher exprimiert. Mit dem Ausdauertraining konnten demnach weniger Genexpressionsunterschiede für SLC-kodierende Gene als mit hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert werden.

Tabelle 17: Genexpressionsunterschiede für ausgewählte SLC-kodierende Gene in der Hypophyse

Gen	Funktion	DUhLB vs DUK_oB			DUK_LB vs oB		
		log2FC	mcpm	FDR	log2FC	mcpm	FDR
SLC2A3	Glukoseaufnahme	0,4	17,3	<0,05	0,2	15,8	0,39
SLC5A5	Natrium/Iodid-Cotransporter	-2,2	2,8	<0,05	-1,9	2,9	<0,05
SLC6A1	GABA-Aufnahme in Präsynapse	-3,3	7,5	<0,05	-0,2	12,9	0,91
SLC6A12	Natrium/Chlorid-Betain/GABA-Transporter	-4,4	2,7	<0,05	-3,6	2,9	<0,05
SLC6A13	Natrium/Chlorid-GABA-Transporter	-4,4	9,2	<0,05	-3,1	9,9	<0,05
SLC6A20A	Kalzium/Aminosäure-Transporter	-6,1	12,4	<0,05	-3,7	13,2	<0,05
SLC7A11	Cystein/Glutamat-transporter	-2,8	6,8	<0,05	-2,4	7,1	<0,05
SLC13A3	Natrium/Anion-Cotransport mit Di/Tricarboxylaten	-2,0	12,1	<0,05	-1,9	12,2	<0,05
SLC13A4	Natrium/Anion-Cotransport mit Sulfat, Selenat, Thiosulfat	-3,9	13,5	<0,05	-3,1	14,2	<0,05
SLC16A1	Ketonkörpertransporter	-0,2	22,8	<0,05	<0,1	24,1	0,99
SLC16A7	Ketonkörpertransporter	-0,2	13,0	0,26	-0,2	13,0	0,30
SLC22A6	Organische Anionen/Endogene Dicarboxylate-Transporter	-5,9	5,3	<0,05	-3,4	5,7	<0,05
SLC22A8	Organische Anionen-Tauscher	-3,7	12,2	<0,05	-2,9	12,9	<0,05
SLC24A2	Kalzium/Kalium-Natrium-Transporter	-0,6	56,8	<0,05	-0,4	58,7	<0,05
SLC27A1	Fettsäuretransporter	0,1	154,4	0,67	<0,1	148,8	0,85
SLC27A4	Fettsäuretransporter	-0,2	46,2	0,28	0,2	52,3	0,41
SLC32A1	GABA-Aufnahme in Vesikel	-0,3	0,8	0,76	1,7	2,0	<0,05
SLCO2A1	Prostaglandin-transporter	-0,8	10,2	<0,05	-0,6	10,7	<0,05

Genexpressionsunterschiede (log2FC) für ausgewählte SLC-kodierende Gene von langzeitselektierten DUhLB-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB) und trainierten Kontrollmäusen (DUK_LB vs oB) im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen (niedriger/höher exprimiert log2FC<0/>0) sowie die Funktion des jeweiligen Gens. Funktionen wurden über <http://slc.bioparadigms.org> (23.04.2021), <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/752> (23.04.2021) recherchiert. Außerdem sind mcpm-Werte des jeweiligen Gens dargestellt, die einen Mittelwert der cpm aus den 16 Proben angeben, die in die Berechnungen des jeweiligen Vergleichs eingingen (siehe 3.2.5). Das Signifikanzniveau der Genexpressionsunterschiede liegt bei FDR=0,05; nicht-signifikante Expressionsunterschiede sind kursiv dargestellt. 14 Gene waren mit hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert. 13 dieser Gene zeigten niedrigere RNA-Level in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen. Nur für ein Gen konnten höhere RNA-Level in Assoziation mit hohem Ausdauerleistungsvermögen quantifiziert werden. In der Hypophyse von trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen wurden für elf Gene niedrigere RNA-Level und für ein Gen höhere RNA-Level gemessen. Diese Expressionsunterschiede konnten demnach mit dem Ausdauertraining in Zusammenhang gebracht werden. Cpm = *count per million*, DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, FDR = *false discovery rate*, GABA = Gammaaminobuttersäure, LB = Laufband, mcpm = *mean count per million*, oB = ohne Belastung, SLC = *solute carrier*, RNA = Ribonukleinsäure

4.3 Validierung der NGS-Expressionsdaten mittels qRT-PCR

Um die NGS-Expressionsdaten stichprobenartig zu überprüfen, wurde eine Validierung einzelner DEGs durchgeführt (siehe 3.2.6). Für die Validierung wurde die Biomark HD Fluidigm® Technologie verwendet. Die Normalisierung der Expressionswerte aus der qRT-PCR-Messung erfolgte mithilfe von drei Haushaltsgenen (HPRT, RPLP2, PGK1v1) im Programm DAG Expression (siehe 3.2.6.5).

4.3.1 Funktionalität der Primerpaare

Nach der Auswahl der zu validierenden DEGs wurden online über das Programm Primer-BLAST Primersequenzen generiert (siehe 3.2.6.1) und auf ihre Funktionalität geprüft (siehe 3.2.6.4).

Für alle Primerpaare wurde über den LightCycler® die Testung anhand einer Verdünnungsreihe einer cDNA-Poolprobe (25-0,025 ng/μl, sieben Werte in Doppelbestimmung sowie Kontrolle ohne *template*) durchgeführt. Mithilfe der LightCycler®480 Software wurde die Standardkurve für die jeweiligen Primerpaare erstellt.

Exemplarisch wird hier die erfolgreiche Testung des Primerpaars für DUXBL1 im PCR-System beschrieben. In der graphischen Darstellung (Abbildung 9) sind die Ct-Werte in Abhängigkeit zum logc aufgetragen; sie steigen mit fallenden Konzentrationen des cDNA *templates*. Aus der inversen Proportionalität zwischen Ct und logc kann die PCR-Effizienz pro Zyklus abgeleitet werden. Hier lag die Effizienz bei 1,945 und der Achsenabschnitt bei 30,36. Zudem wurde der Standardfehler der Regression betrachtet, welcher anzeigt, wie gut die einzelnen Punkte der Standardreihe auf der Regressionsgeraden liegen. Dieser Wert sollte kleiner 0,2 sein.

Am Ende der Primertestung wurden 43 Primerpaare zusammen mit fünf Primerpaaren für Haushaltsgene für die Analyse mittels qRT-PCR ausgewählt (Tabelle 3).

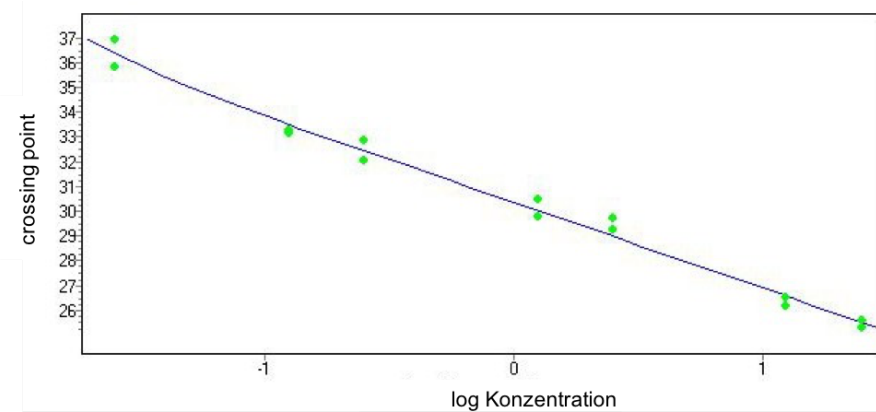


Abbildung 9: Standardkurve zur Primertesting des Primerpaars DUXBL1. Für jedes Primerpaar wurde im Vorfeld der Validierung der NGS-Daten eine Primertesting mittels LightCycler® durchgeführt, um die Funktionalität der Primer zu bestimmen. Hier abgebildet ist die Standardkurve für das Primerpaar DUXBL1 mit einem Anstieg = -3,461 und einem Achsenabschnitt = 30,36. Daraus ließ sich eine PCR-Effizienz von 1,945 und ein Standardfehler der Regression von 0,0317 berechnen. Jeder Punkt in der Abbildung entspricht einem Wertepaar für eine Konzentration (logarithmiert) und dem zugehörigen *crossing point*. Pro Konzentrationsstufe wurden zwei Wiederholungen durchgeführt. 14 Wertepaare konnten in die Erstellung der Standardkurve für DUXBL1 einbezogen werden. Die Wertepaare sind in der Supplementären Tabelle 2 aufgeführt. Die Abbildung wurde adaptiert nach einer Abbildung aus dem LightCycler®480 Software Report. DUXBL1 = Doppel Homöobox B-ähnlich 1, NGS = *next generation sequencing*, PCR = Polymerasekettenreaktion

4.3.2 Vergleich der Expressionsdaten aus den NGS- und qRT-PCR-Messungen

Die Validierung der NGS-Expressionswerte der Hypophyse von trainierten und untrainierten DUhLB- und Kontrollmäusen erfolgte im BioMark HD System für 31 Proben aus dem Trainingsversuch und die schon zur Primertesting verwendete Standardreihe der Poolprobe (siehe 3.2.6.5). Von den 48 Primerpaaren wurden 45 für die relative Quantifizierung der Expression berücksichtigt (94%), davon fünf für Haushaltsgene. Aufgrund unzureichender Amplifikationen in der qRT-PCR war die Messung der Expression von drei Genen (Kaliziumkalmodulin-abhängige Proteinkinase 2A (CAMK2A), Claudin 19 (CLDN19), zelluläres retinsäurebindendes Protein 1 (CRABP1)) nicht möglich.

Die Berechnung der Ct-Werte erfolgte mittels der Software Fluidigm Real-Time PCR Analysis. Die Amplifikation der DNA-*templates* in der letzten Verdünnungsstufe gelang infolge der sehr geringen cDNA-Menge nur unzureichend und konnte daher für die meisten Auswertungen nicht einbezogen werden. Insgesamt wurden ausreichend Verdünnungen gemessen, so dass die letzte Stufe zu vernachlässigen war. Die gewählten Primerkombinationen für die Amplifikation der DNA-*templates* der Haushaltsgene zeigten niedrige Ct-Werte und daher eine exponentielle Amplifikation in frühen Zyklen.

Für die Normalisierung und Berechnung der relativen Expression wurde das Programm DAG Expression genutzt. Anhand des *m-values* erfolgte die Auswahl der Haushaltsgene für die Normalisierung der Daten. Da HPRT1 (*m-value*=0,201), RPLP2 (*m-value*=0,192) und PGK1v1 (*m-value*=0,192) die geringsten *m-values* aufwiesen, wurden sie zur Normalisierung ausgewählt. Über die Datenpunkte der Standardreihe wurde eine Regressionsgerade erstellt, anhand derer die relative Expression der Transkripte in den Einzelproben über deren Ct-Wert ermittelt werden konnte.

Um die Korrelation zwischen den Expressionsdaten der Hypophyse aus der qRT-PCR-Messung und der Sequenzierung mittels NGS zu vergleichen, wurden die log2FC der DEGs dargestellt (Tabelle 18). Aus den log2FC-Werten der beiden Methoden wurde eine Regressionsgerade zur Kontrolle der Korrelation generiert (Abbildung 10). Die Wertepaare ordneten sich entlang der Regressionsgerade an, wobei die Streuung im Vergleich DUhLB vs DUK_oB breiter war. Aus den Regressionsgeraden ließ sich der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r für intervallskalierte Merkmale berechnen. Dieser betrug $r=0,65$ (DUhLB vs DUK_oB) bzw. $r=0,88$ (DUK_LB vs oB).

Tabelle 18: Vergleich der mit NGS- und qRT-PCR-bestimmten Genexpressionsunterschiede

DEGs		DUhLB vs DUK_oB		DUK_LB vs oB	
		log2FC	p-value	log2FC	p-value
ATP13A5	NGS	-3,9113	0,0001	-3,1778	0,0009
	qRT-PCR	-2,9306	0,0347	-1,2123	0,1322
CAMKV	NGS	-0,3516	0,7039	3,5047	0,0004
	qRT-PCR	-0,7898	0,1158	3,1554	0,1651
CBX3-ps7	NGS	-7,6786	<0,0001	-1,6696	0,1384
	qRT-PCR	0,0230	0,3499	-0,2173	0,0189
CDH22	NGS	1,3760	0,0002	1,5801	<0,0001
	qRT-PCR	1,2902	0,0003	1,3731	0,0252
CHIA1	NGS	1,3348	<0,0001	0,7457	0,0014
	qRT-PCR	1,2079	<0,0001	0,5491	0,0882
COL3A1	NGS	-0,7074	<0,0001	-0,5564	0,0001
	qRT-PCR	-0,4558	0,0095	-0,4378	0,0320
DUXBL1	NGS	5,3268	<0,0001	-0,5418	0,5775
	qRT-PCR	0,7131	0,0004	-0,1525	0,2433
ESR1	NGS	-0,3170	0,0016	-0,4542	<0,0001
	qRT-PCR	0,1047	0,4144	-0,7033	0,1184
FN1	NGS	-3,1938	<0,0001	-2,6146	<0,0001
	qRT-PCR	-1,9814	0,0539	-1,3829	0,1079
GABRA3	NGS	1,4487	0,0003	1,2768	0,0013
	qRT-PCR	1,5803	<0,0001	1,6308	0,0727
GAD1	NGS	-0,0437	0,9467	3,0597	<0,0001
	qRT-PCR	-0,5389	0,0686	1,5704	0,1637
GAT/SLC6A13	NGS	-4,4279	<0,0001	-3,0507	0,0001
	qRT-PCR	-1,9759	0,0536	-0,4912	0,0824
GM4804	NGS	4,6371	<0,0001	-0,9499	0,2697
	qRT-PCR	2,4996	<0,0001	-0,1858	0,3656
GPR149	NGS	-1,1831	<0,0001	-1,0034	<0,0001
	qRT-PCR	-0,9751	0,0431	-1,2412	0,0180
GRM4	NGS	-0,0063	0,9936	3,1810	<0,0001
	qRT-PCR	0,0368	0,4429	0,8879	0,1135
H2-Q7	NGS	-3,2046	<0,0001	-0,7685	0,0686
	qRT-PCR	-0,8287	0,0004	-0,3137	0,0970
HIST1H2AL	NGS	-7,0335	<0,0001	0,7375	0,0957
	qRT-PCR	-0,3045	0,0153	-0,1271	0,1945
HIST2H2BB	NGS	-6,8862	<0,0001	0,1943	0,6080
	qRT-PCR	-2,3956	<0,0001	-0,0200	0,4800
IGF2	NGS	-4,2768	<0,0001	-3,2172	0,0002
	qRT-PCR	-1,9991	0,0960	-1,6388	0,1381

INSRR	NGS qRT-PCR	-2,3049 -1,8934	0,0004 0,0449	-2,2598 -1,9571	0,0005 0,0543
KCNJ13	NGS qRT-PCR	-5,4263 -0,3577	<0,0001 0,1073	-3,9596 -0,3635	0,0005 0,1209
LEPR	NGS qRT-PCR	-1,3298 -1,1106	<0,0001 0,0372	-0,9968 -0,7722	0,0008 0,0994
MYBPC1	NGS qRT-PCR	1,6894 -0,0575	0,0019 0,4360	2,0187 0,1505	0,0002 0,3470
NPHS2	NGS qRT-PCR	-2,2989 -1,2147	0,0036 0,1124	-3,3906 -2,1570	<0,0001 0,1103
PDYN	NGS qRT-PCR	2,2252 2,2942	<0,0001 0,0004	0,8178 0,5201	0,0014 0,0155
PPP1R17	NGS qRT-PCR	2,2716 2,2930	<0,0001 0,0010	2,1606 2,1149	<0,0001 0,0013
RPL26	NGS qRT-PCR	1,4190 -0,0241	<0,0001 0,2911	1,3129 -0,0057	<0,0001 0,4598
RPS26-ps1	NGS qRT-PCR	6,2187 -0,1235	<0,0001 0,0048	0,4344 0,0174	0,3936 0,4092
RPS2-ps13	NGS qRT-PCR	6,5767 0,6105	<0,0001 0,0011	0,3761 -0,0729	0,2430 0,4310
SERPINA1	NGS qRT-PCR	-3,3727 -2,9142	<0,0001 0,0603	-2,5122 -2,2072	0,0003 0,0946
SLC13A3	NGS qRT-PCR	-1,9930 -1,6433	0,0013 0,0949	-1,9446 -1,4154	0,0016 0,1314
SLC13A4	NGS qRT-PCR	-3,8806 -2,0278	<0,0001 0,0552	-3,0815 -1,7479	0,0001 0,0825
SLC22A8	NGS qRT-PCR	-3,7228 -1,5480	<0,0001 0,0489	-2,8533 -0,4844	0,0001 0,0800
SLC7A11	NGS qRT-PCR	-2,8264 -2,9056	<0,0001 0,0556	-2,4026 -1,8890	0,0002 0,1040
SLFN8	NGS qRT-PCR	4,1365 0,3309	<0,0001 0,0935	-0,8439 -0,1411	0,2152 0,3619
SPHK1	NGS qRT-PCR	-3,6944 -2,7216	<0,0001 0,0572	-2,5391 -1,9377	0,0013 0,0998
SYT2	NGS qRT-PCR	-1,8744 -1,2712	0,0782 0,0154	4,1391 3,9336	0,0002 0,1528
TNFRSF11B	NGS qRT-PCR	-1,7033 -0,6450	<0,0001 0,0132	-1,3219 -0,4697	<0,0001 0,0359
VTN	NGS qRT-PCR	-1,8826 -1,6723	<0,0001 0,0334	-1,2744 -1,1398	0,0004 0,0833
WNT6	NGS qRT-PCR	-2,8909 -2,2728	0,0001 0,0547	-2,4108 -1,9607	0,0005 0,0811

Die technische Validierung der NGS-Daten aus der Hypophyse von trainierten und untrainierten DUHLB- und DUK-Mäusen erfolgte mittels qRT-PCR. Hier abgebildet sind die gemessenen Expressionsunterschiede (log2FC) der 40 evaluierten Gene aus den NGS- (32 Mäuse) und qRT-PCR-Daten (31 Mäuse) sowie dazugehörige *p-values* der beiden untersuchten Vergleiche (DUHLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB). Der Expressionsunterschied ist anhand des log2FC dargestellt: erhöht/erniedrigt exprimiert log2FC>0/<0. 40 DEGs konnten in die Auswertung der Validierung einbezogen werden. Als erfolgreich validiert galten DEGs, die einen log2FC in den NGS- und qRT-PCR-Daten in die gleiche Richtung (höher/niedriger) differentiell exprimiert hatten. Die Wertepaare mit einem *p-value* <0,05 sind fett gedruckt. DEG = differentiell exprimiertes Gentranskript, DUHLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = fold change, LB = Laufband, NGS = next generation sequencing, oB = ohne Belastung, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion. Gennamen siehe Abkürzungsverzeichnis

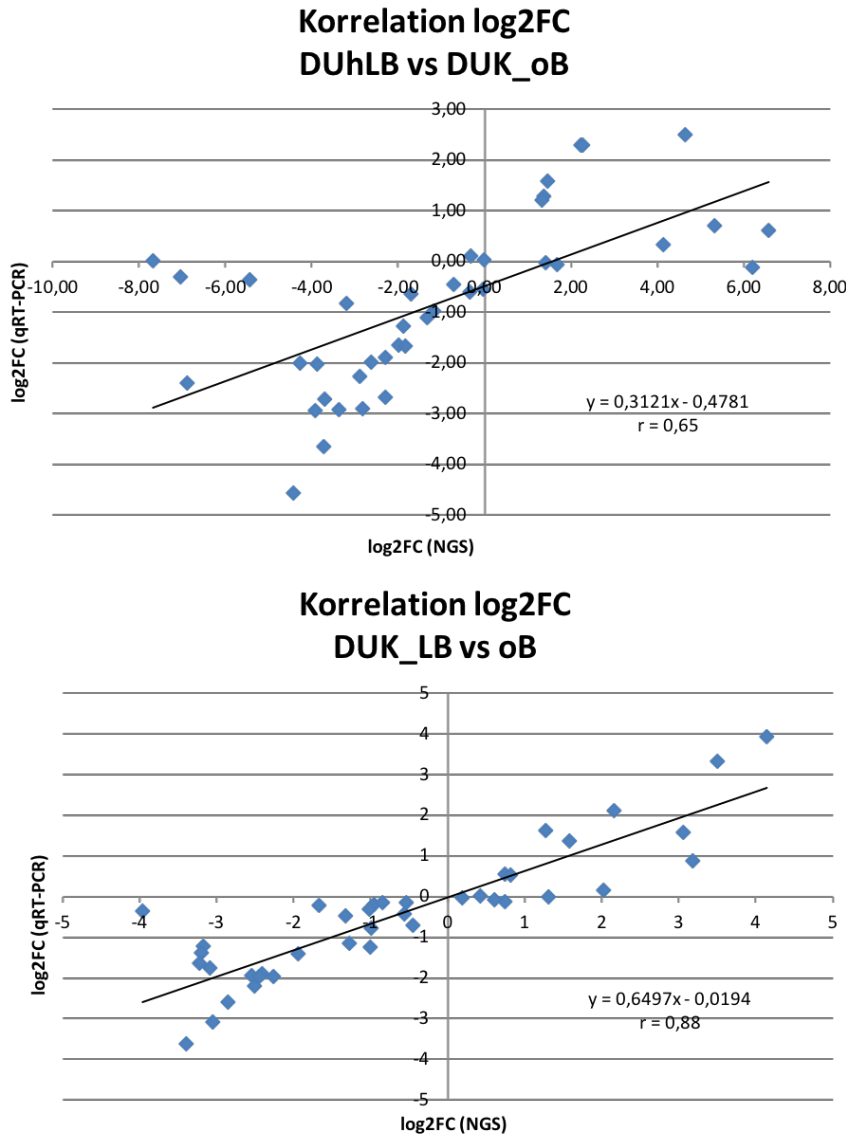


Abbildung 10: Korrelation zur Validierung der NGS-Daten. Die technische Validierung der NGS-Daten aus der Hypophyse von trainierten und untrainierten DUhLB- und DUK-Mäusen erfolgte mittels qRT-PCR. Hier abgebildet sind die linearen Regressionsgeraden, welche die Korrelation aus den in Tabelle 18 aufgeführten log2FC aus NGS und qRT-PCR darstellt. Jeder Punkt entspricht dem Wertepaar für ein evaluiertes Gentranskript. Für die Ermittlung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r und der Gleichung der linearen Regressionsgeraden y wurden die Daten zu 40 Genen verwendet. DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, LB = Laufband, NGS = *next generation sequencing*, oB = ohne Belastung, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion, r = Pearson'scher Korrelationskoeffizient, y = Gleichung der linearen Regressionsgerade

4.4 Funktionelle Analyse der Genexpressionsunterschiede in der Hypophyse von untrainierten DUhLB- und trainierten Kontrollmäusen

Für die funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde das Programm IPA® verwendet, um die NGS-Daten der Hypophyse von langzeitselektierten DUhLB-Mäusen und trainierten Kontrollmäusen durch aktuelle Literatur in einen wissenschaftlichen Kontext zu bringen.

Es wurden Genexpressionsunterschiede mit einem Signifikanzwert von $FDR < 0,05$ für die Analyse genutzt. Auf einen zusätzlichen Filter über den \log_2FC wurde verzichtet, um auch geringe Unterschiede der Expression zwischen den Gruppen nicht zu verlieren. Im Folgenden wird zwischen schwach ($\log_2FC < 1 / > -1$), stark ($\log_2FC > 1 / < -1$) und sehr stark ($\log_2FC > 2 / < -2$) exprimierten Genen in der Hypophyse der DUhLB- und Kontrollmäuse unterschieden. Die NGS-Daten wurden in IPA® mit der *core*-Analyse ausgewertet, um anhand der Genexpressionsunterschiede in der Hypophyse den Energiestoffwechsel der DUhLB-Mäuse besser zu verstehen.

4.4.1 Geninteraktionsnetzwerk-Analyse

Es erfolgten Analysen von Geninteraktionsnetzwerken mittels IPA®. Die Analyse basiert auf der direkten und indirekten regulatorischen Assoziation von Molekülen, um diese, auf der Grundlage von wissenschaftlichen Veröffentlichungen, in einen Kontext zu stellen. Die DEGs in der Hypophyse von untrainierten DUhLB- im Vergleich mit untrainierten DUK-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB) wurden in 25 Geninteraktionsnetzwerken verknüpft. Für die DEGs der Hypophyse der trainierten DUK-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB) ergaben sich 20 Geninteraktionsnetzwerke. Hohe IPA®-scores in den Top 5-Geninteraktionsnetzwerken der beiden Vergleiche beschreiben einen signifikanten *p-value* für das jeweilige Netzwerk (siehe 3.2.7, DUhLB vs DUK_oB: IPA®-score 47 bis 35 und DUK_LB vs oB: IPA®-score 49 bis 37). Anschließend wurde die Analyse über die *overlay*-Funktion von IPA®, die eine überlappende Darstellung von Geninteraktionsnetzwerken zweier Vergleiche ermöglicht, durchgeführt. Hierfür wurde eine exemplarische Auswahl von vier Geninteraktionsnetzwerken anhand der in 3.2.7 beschriebenen Kriterien erstellt und Schlüsselgene in den vier Darstellungen anhand der in 3.2.8 beschriebenen Kriterien ausgewählt.

Ein durch IPA® erstelltes Geninteraktionsnetzwerk, welches DEGs des Vergleichs von untrainierten DUhLB-Mäusen zu untrainierten Kontrollmäusen zeigt (DUhLB vs DUK_oB), war das ALDH-assoziierte Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse (Abbildung 11a). In diesem Geninteraktionsnetzwerk sind Moleküle rund um die Gruppe der Aldehyddehydrogenasen (ALDH) dargestellt. Die meisten zur funktionellen Gruppe der ALDH zugehörigen Gene waren in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen niedriger exprimiert, am niedrigsten ALDH3A1. Lediglich ALDH3A2- und ALDH3B2-RNA-Level waren in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen höher. Im Geninteraktionsnetzwerk waren zudem drei Untereinheiten des ionotropen GABA-A Rezeptors (GABR) als differentiell exprimiert dargestellt, wobei die DEGs der Untereinheiten A3 (GABRA3) und G3 (GABRG3) die stärksten Expressionsunterschiede aufwiesen. Durch die *overlay*-Funktion mit den NGS-Daten trainierter Kontrollmäuse im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen (DUK_LB vs oB) konnten in diesem Geninteraktionsnetzwerk ebenfalls drei Moleküle als differentiell exprimiert dargestellt werden (Abbildung 11a, bunte Kreise um die Knotenpunkte; siehe zudem Supplementäre Abbildung 4). GABRA3 zeigte sowohl in Assoziation zu hohem Ausdauerleistungsvermögen (DUhLB vs DUK_oB) als auch in Assoziation zum Training (DUK_LB vs oB) stark erhöhte RNA-Level ($\log_2FC > 1$), weshalb es als Schlüsselgen ausgewählt wurde (Abbildung 11b). Der *solute carrier* Transporter SLC24A2 war sowohl in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse als auch in der Hypophyse trainierter DUK-Mäuse, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, niedriger exprimiert und konnte deshalb auch als Schlüsselgen für hohes Ausdauerleistungsvermögen und Training ausgewählt werden (Abbildung

11b), während das dritte Molekül, das Shisa Familienmitglied 7 (SHISA7) in untrainierten DUhLB-Mäusen höher und in trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen niedriger exprimiert war. Obwohl GABRG3 in der Hypophyse trainierter DUK-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen keinen Expressionsunterschied zeigte, wurde GABRG3 aufgrund des starken Expressionsunterschieds ($\log_2FC > 1$) in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen und seinem funktionellen Zusammenhang mit GABRA3 als Schlüsselgen für hohes Ausdauerleistungsvermögen ausgewählt (Abbildung 11b).

Das Geninteraktionsnetzwerk zur ESR1 Regulation in der Hypophyse (Abbildung 12a), welches Beziehungen zwischen DEGs untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen (DUhLB vs DUK_oB) abbildet, bestand aus 34 Genen. ESR1 nahm dabei eine zentrale Stellung in der Regulation und Bindung über 20 verschiedener Gene ein. DEGs, welche funktionell der gleichen Gruppe zugeordnet werden konnten, wie bspw. Dyneine (DNAH) oder Histone (HIST), zeigten ebenfalls Vernetzungen. Im Geninteraktionsnetzwerk waren vier Gene sehr stark ($\log_2FC > 2 / < -2$) differentiell exprimiert und somit mit hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert: Anoktamin 2 (ANO2), DNAH10, SLC13A4 und *potassium inwardly-rectifying channel subfamily J member 13* (KCNJ13). Wurden die NGS-Daten aus der Hypophyse von trainierten Kontrollmäusen im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen (DUK_LB vs oB) in der *overlay*-Funktion betrachtet, waren die RNA-Level von zwei Genen sehr stark vermindert ($\log_2FC < -2$, Abbildung 12a, bunte Kreise um die Knotenpunkte; siehe zudem Supplementäre Abbildung 5): SLC13A4 und KCNJ13. ESR1-Transkripte aus der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, zeigten ebenfalls niedrigere Level (Abbildung 12a). ESR1, SLC13A4 und KCNJ13 konnten somit als Schlüsselgene für hohes Ausdauerleistungsvermögen und Training ausgewählt werden (Abbildung 12b). Zusätzlich wurde ANO2 als Schlüsselgen für hohes Ausdauerleistungsvermögen ausgewählt. Außerdem ist POU1F1 in Abbildung 12b als weiteres Schlüsselgen für hohes Ausdauerleistungsvermögen und Training aufgeführt, da es funktionell in den Zusammenhang mit ESR1 gebracht werden kann. Auch die Transkripte von Transmembran 4 L6 Familienmitglied 1 (TM4SF1) und *bone morphogenetic protein* (BMP) waren sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen höher bzw. niedriger, aber weniger deutlich, differentiell exprimiert.

Im Wachstumsfaktor-assoziierten Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse (Abbildung 13a), welches DEGs in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB, genetischer Vergleich) abbildet, konnten 33 Gene in einem Geninteraktionsnetzwerk dargestellt werden. Wachstums-assoziierte Gene wie *Early growth response protein 1* und 2 (EGR1 und EGR2) waren in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen niedriger exprimiert. Auch Stoffwechsel-assoziierte Gene, wie CD36, IGF2 oder *low density* Lipoprotein (LDL), waren in diesem Vergleich niedriger exprimiert. In der *overlay*-Funktion mit den NGS-Daten trainierter Kontrollmäuse im Vergleich zu den Daten untrainierter Kontrollmäuse (DUK_LB vs oB) waren zu diesem Netzwerk sechs Gene als differentiell exprimiert dargestellt. Davon waren fünf in der Hypophyse von trainierten DUK-Mäusen niedriger exprimiert als in der Hypophyse von untrainierten DUK-Mäusen (Abbildung 13a, bunte Kreise um die Knotenpunkte; siehe auch Supplementäre Abbildung 6). Die Transkriptlevel für IGF2 und Sphingosinkinase 1 (SPHK1) sowie H2-Q6 (Haupthistokompatibilitätskomplex II) und *tripartite motif containing 5* (TRIM5) zeigten in der Hypophyse trainierter im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, ebenso wie in den untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen,

niedrigere Werte und konnten somit mit Training und hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert werden. Die Expression von TRIM5 war hingegen in trainierten DUK-Mäusen höher als in untrainierten DUK-Mäusen und in untrainierten DUHLB-Mäusen niedriger als in untrainierten DUK-Mäusen. *Transforming growth factor beta receptor 2* (TGFB2) wies sowohl in untrainierten DUHLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, einen schwachen ($\log_2FC > -1$) Expressionsunterschied auf. Ausgewählte Schlüsselgene für hohes Ausdauerleistungsvermögen und Training sind in Abbildung 13b aufgezeigt. Die Wahl fiel auf EGR1, EGR2 (beide für Ausdauerleistungsvermögen), IGF2 und SPHK1 (beide für Ausdauerleistungsvermögen und Training).

Im Geninteraktionsnetzwerk zur NF κ B-Regulation in der Hypophyse (Abbildung 14a) untrainierter DUHLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten Kontrollen (DUHLB vs DUK_oB) wurden 26 Gene dargestellt, wobei die zentrale Position der NF κ B-Komplex einnahm. In diesem Geninteraktionsnetzwerk wurden auch drei SLC6-Transporter abgebildet (SLC6A1, SLC6A12, SLC6A13), deren RNA-Level in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen sehr stark ($\log_2FC < -2$) niedriger waren. Die überlappende Darstellung der Genexpression trainierter Kontrollmäuse im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen (DUK_LB vs oB) in der *overlay*-Funktion zeigte sieben DEGs (Abbildung 14a, bunte Kreise um die Knotenpunkte; siehe auch Supplementäre Abbildung 7). Die SLC6-Transporter waren, mit Ausnahme von SLC6A1, sowohl in untrainierten DUHLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen niedriger exprimiert. Die Transporter wurden daher als Schlüsselgene für hohes Ausdauerleistungsvermögen (alle) und Training (nur SLC6A12 und SLC6A13) ausgewählt (Abbildung 14b). Auch das *insulin receptor-related protein* (INSRR) und das *secreted frizzled-related protein 1* (SFRP1) -letzteres wurde auch als Schlüsselgen für hohes Ausdauerleistungsvermögen und Training ausgewählt- zeigten in der Hypophyse trainierter DUK-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen eine starke ($\log_2FC < -1$) Expressionsverminderung. Zudem waren Cadherin 22 (CDH22) und Tetraspanin 33 (TSPAN33) sowohl in untrainierten DUHLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, höher exprimiert.

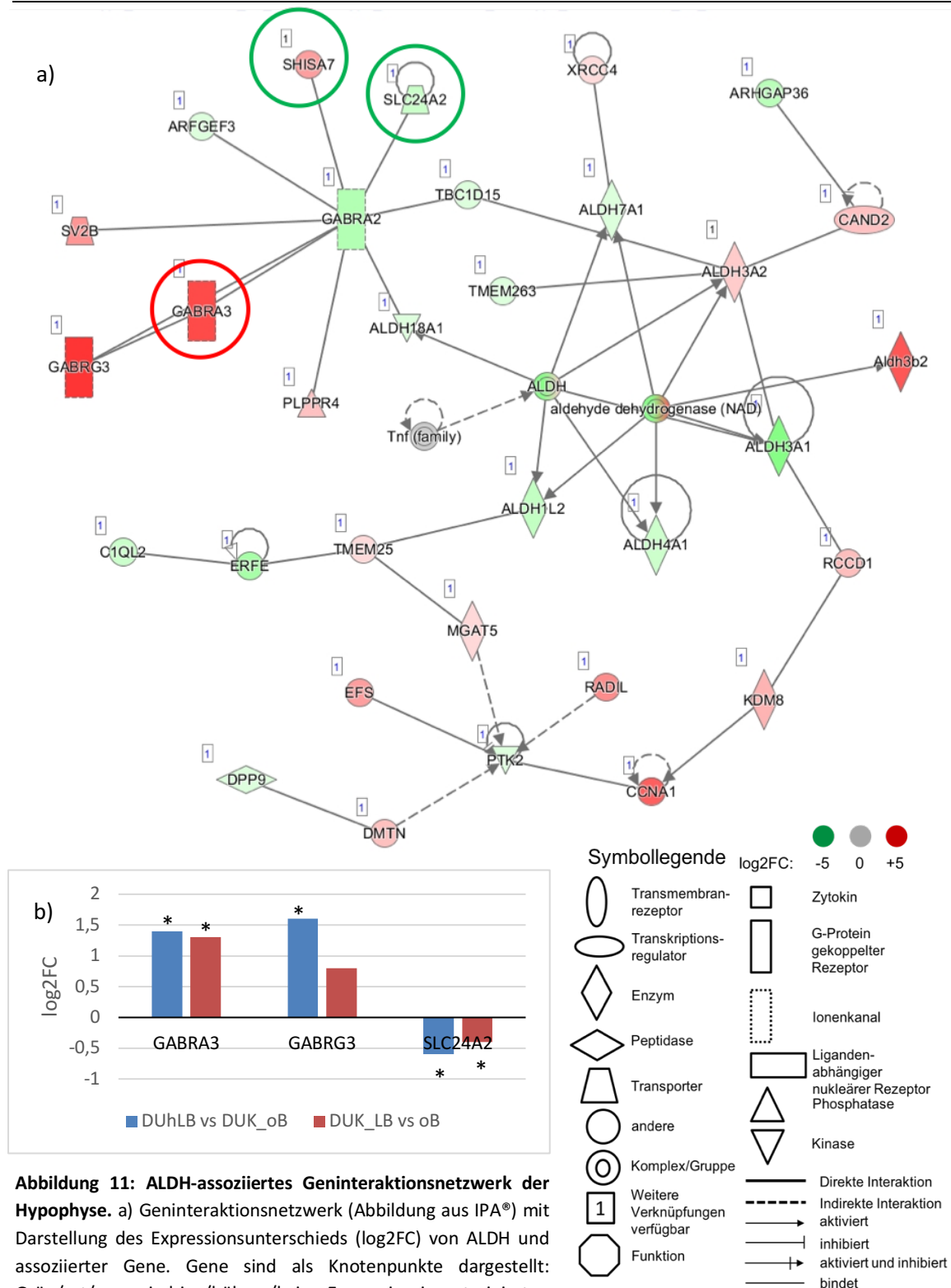


Abbildung 11: ALDH-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse. a) Geninteraktionsnetzwerk (Abbildung aus IPA®) mit Darstellung des Expressionsunterschieds (log2FC) von ALDH und assoziierter Gene. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt: Grün/rot/grau niedrige/höhere/keine Expression in untrainierten DUHLB- im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUHLB vs DUK_oB). Kreise um einen Knotenpunkt (grün/rot) zeigen einen Expressionsunterschied (niedriger/höher) im Vergleich trainierter zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). b) Balkendiagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede (log2FC) ausgewählter Schlüsselgene aus a) (*: FDR<0,05) aus beiden Vergleichen. Hohe GABRA3-RNA-Level in der Hypophyse waren assoziiert sowohl mit hohem Ausdauerleistungsvermögen als auch mit Ausdauertraining. So zeigten untrainierte DUHLB-Tiere und trainierte DUK-Tiere eine mehr als doppelt so hohe Expression dieses Gens als untrainierte DUK-Mäuse. GABRG3-Level waren hingegen nur in untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen erhöht. SLC24A2-Level waren in untrainierten DUHLB- und trainierten DUK-Mäusen niedriger exprimiert als in untrainierten DUK-Mäusen. DUHLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = fold change, FDR = false discovery rate, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung, RNA = Ribonukleinsäure

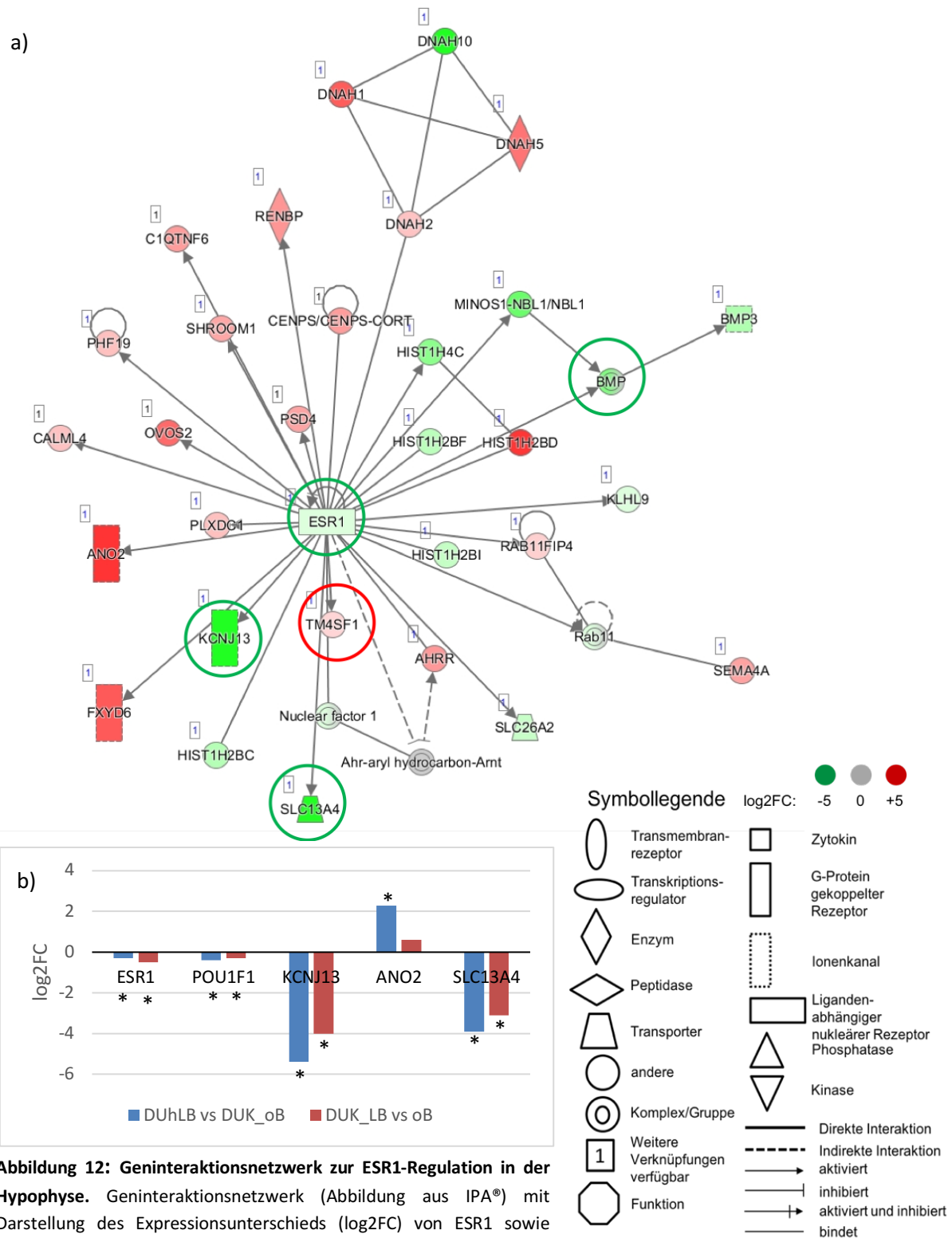


Abbildung 12: Geninteraktionsnetzwerk zur ESR1-Regulation in der Hypophyse. Geninteraktionsnetzwerk (Abbildung aus IPA®) mit Darstellung des Expressionsunterschieds (log2FC) von ESR1 sowie assoziierter Gene. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt:

Grün/rot/grau niedrige/höhere/keine Expression in untrainierten DUhLB- im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB). Kreise um einen Knotenpunkt (grün/rot) zeigen einen Expressionsunterschied (niedriger/höher) im Vergleich trainierter zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). b) Balkendiagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede (log2FC) ausgewählter Schlüsselveile aus a) (*: FDR<0,05) aus beiden Vergleichen. Mit Ausnahme von ANO2 waren niedrige RNA-Level aller identifizierten Schlüsselmoleküle mit hohem Ausdauerleistungsvermögen und Ausdauertraining assoziiert. Sowohl in der Hypophyse von untrainierten DUhLB- als auch in trainierten DUK-Mäusen waren die RNA-Level von ESR1, POU1F1, KCNJ13 und SLC13A4 niedriger als in untrainierten DUK-Mäusen. ANO2-Level waren in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen erhöht. DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = fold change, FDR = false discovery rate, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung, RNA = Ribonukleinsäure

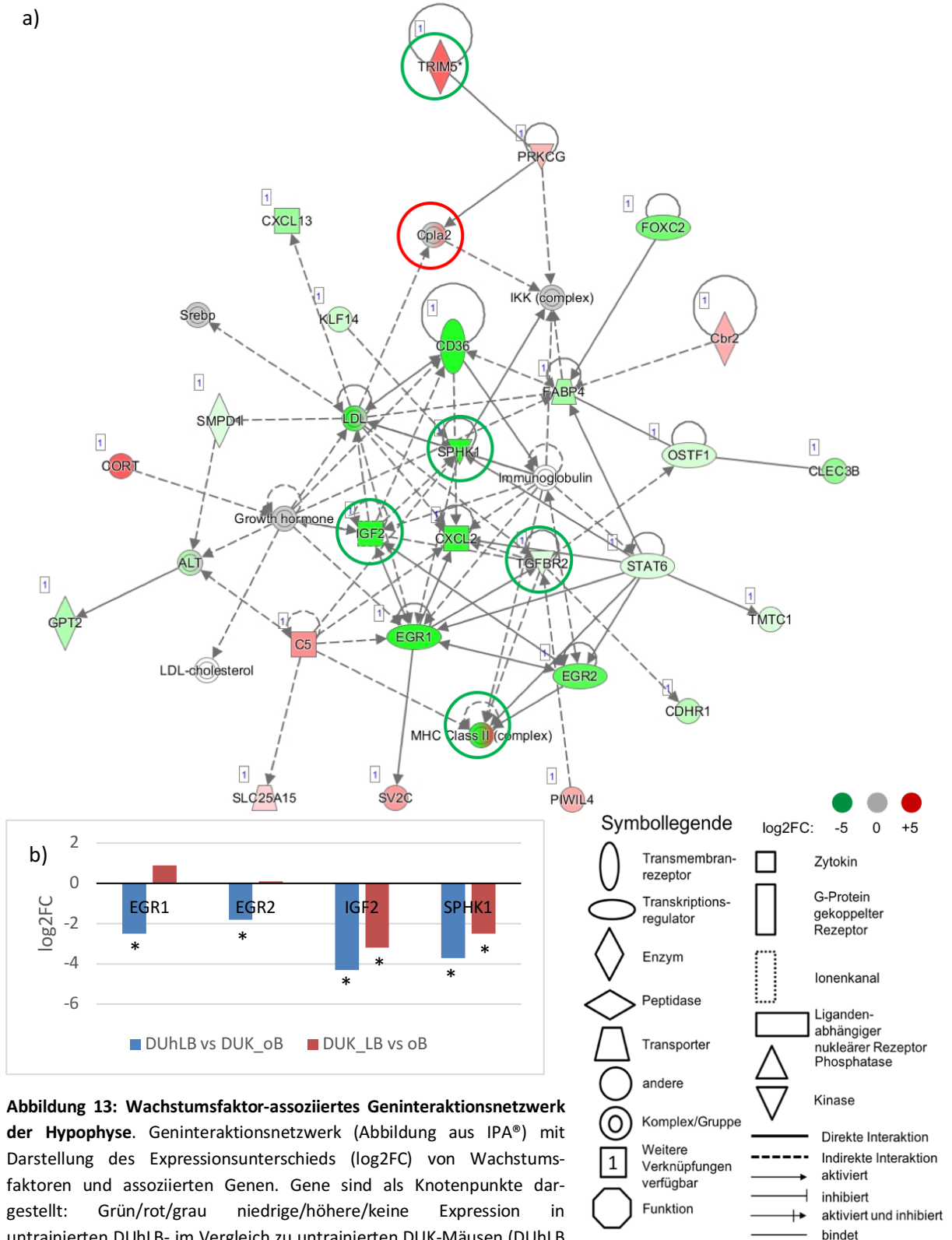


Abbildung 13: Wachstumsfaktor-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse. Geninteraktionsnetzwerk (Abbildung aus IPA®) mit Darstellung des Expressionsunterschieds (log2FC) von Wachstumsfaktoren und assoziierten Genen. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt: Grün/rot/grau niedrige/höhere/keine Expression in untrainierten DUhLB- im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB). Kreise um einen Knotenpunkt (grün/rot) zeigen einen Expressionsunterschied (niedriger/höher) im Vergleich trainierter zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). b) Balkendiagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede (log2FC) ausgewählter Schlüsselve aus a) (*: FDR<0,05) aus beiden Vergleichen. Niedrige RNA-Level von EGR1 und EGR2 waren mit hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert, da in der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen eine um mehr als zweifach niedrigere Expression quantifiziert wurde als in untrainierten DUK-Mäusen. Niedrige RNA-Level von IGF2 und SPHK1 waren sowohl mit hohem Ausdauerleistungsvermögen als auch mit Training assoziiert. Untrainierte DUhLB-Tiere und trainierte DUK-Tiere zeigten eine deutlich niedrigere Expression dieser Gene als untrainierte DUK-Mäuse. DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = fold change, FDR = false discovery rate, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung, RNA = Ribonukleinsäure

a)

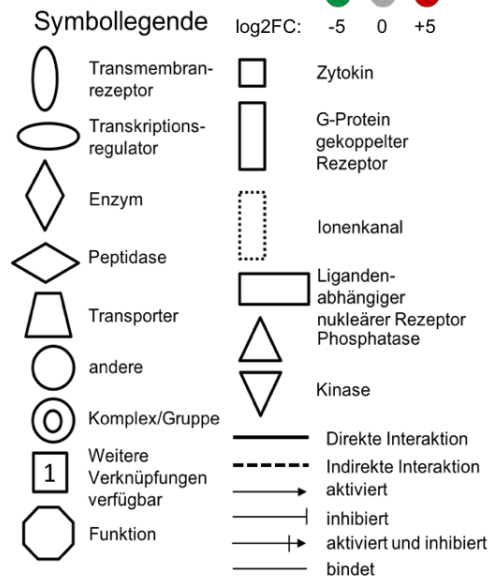
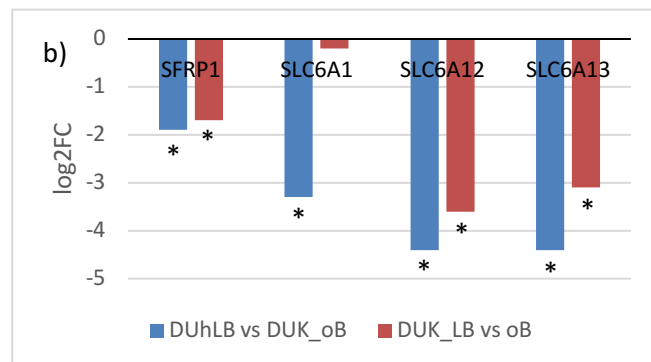
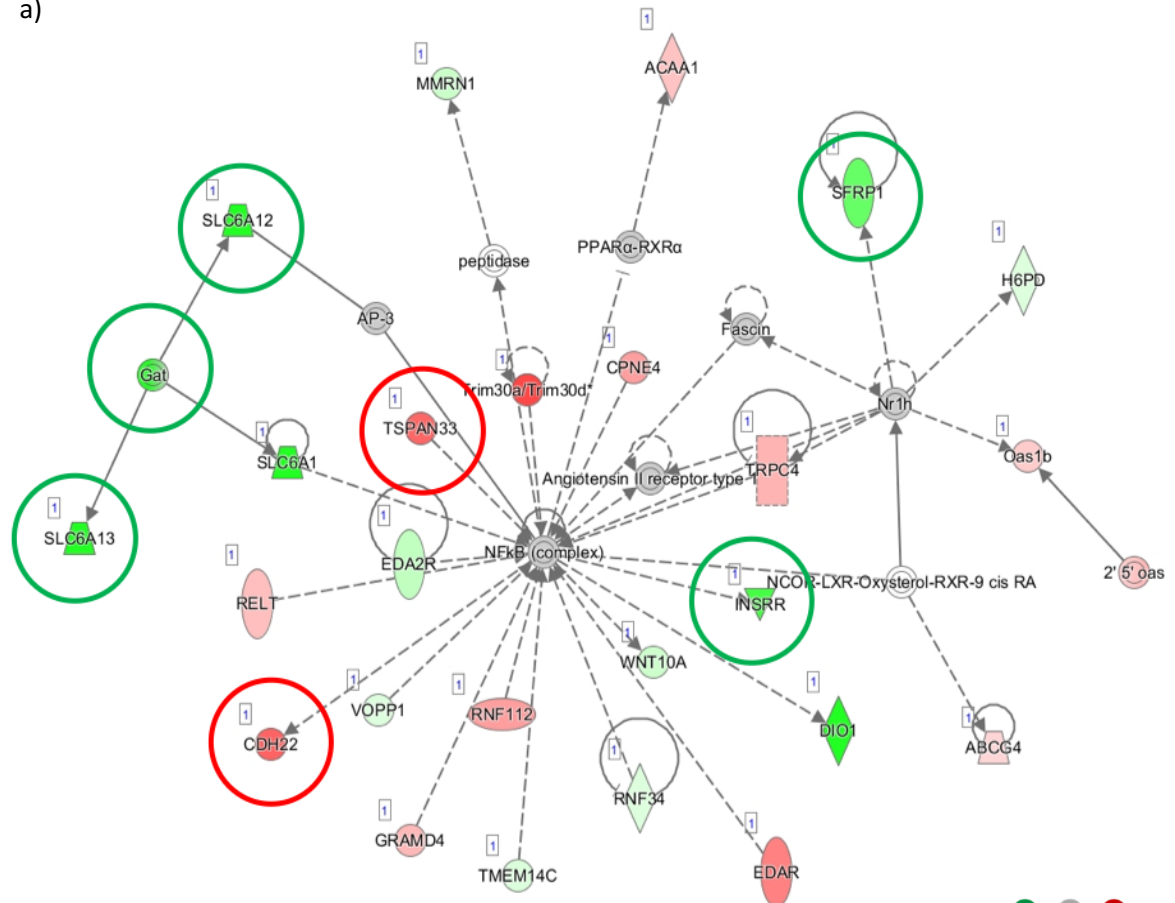


Abbildung 14: Geinteraktionsnetzwerk zur NFκB-Regulation in der Hypophyse. Geninteraktionsnetzwerk (Abbildung aus IPA®) mit Darstellung des Expressionsunterschieds (log2FC) des NFκB-Komplexes und assoziierter Gene. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt: Grün/rot/grau niedrige/höhere/keine Expression in untrainierten DUHLB- im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUHLB vs DUK_oB). Kreise um einen Knotenpunkt (grün/rot) zeigen einen Expressionsunterschied (niedriger/höher) im Vergleich trainierter zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). b) Balkendiagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede (log2FC) ausgewählter Schlüsselgene aus a) (*: FDR<0,05) aus beiden Vergleichen. Bis auf SLC6A1 waren niedrige RNA-Level in der Hypophyse aller identifizierten Schlüsselgene mit hohem Ausdauerleistungsvermögen und Ausdauertraining assoziiert. So zeigten untrainierte DUHLB-Mäuse und trainierte DUK-Mäuse eine knapp zweifach niedrigere (SFRP1) bis mehr als sechsfach niedrigere (SLC6A12, SLC6A13) Expression dieser Gene als untrainierte DUK-Mäuse. Außerdem waren niedrige SLC6A1-RNA-Level mit hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert, da in der Hypophyse untrainierter DUHLB-Mäuse eine gut sechsfach niedrigere Expression des Gens als in untrainierten DUK-Mäusen gemessen werden konnte. DUHLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = fold change, FDR = false discovery rate, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung, RNA = Ribonukleinsäure

4.4.2 Upstream-Regulatoren-Analyse

In der *upstream*-Analyse von IPA® werden potentielle *upstream*-Regulatoren vorhergesagt. Die Regulatoren sowie die in Beziehung stehenden Moleküle und Prozesse werden als *regulator effects*, ähnlich den Geninteraktionsnetzwerken, im Kontext visualisiert und ermöglichen eine andere Betrachtungsweise auf die Funktion der Gene.

Ein *regulator effect* zum Fettstoffsäuremetabolismus in der Hypophyse wurde für den Vergleich der nicht-trainierten DUHLB-Mäuse zu nicht-trainierten DUK-Mäusen mittels IPA® untersucht (DUHLB vs DUK_oB, Abbildung 15a, oben). Da Fettsäuren beim Ausdauersport eine wichtige Rolle zur Versorgung der Muskeln spielen (siehe 1.1.2), wurde dieser *regulator effect* für das bessere Verständnis des Energiestoffwechsels der DUHLB-Mäuse als wichtig erachtet. Die Fettsäuretransporter SLC27A1 und SLC27A4 waren in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen nicht differentiell exprimiert (siehe Tabelle 17). Im *regulator effect* zum Fettstoffwechsel (Abbildung 15a) zeigten sich somit acht andere DEGs (*amyloid precursor protein* (APP), CC-Chemokin Ligand (CCL2), CD36, EGR1, FABP4, Apoptose Antigen 1 (Fas-Rezeptor, FAS), Fibronectin 1 (FN1) und IGF2), welche funktionell mit dem Fettstoffwechsel assoziiert waren. Während für CCL2 und FAS eine höhere Expression in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen nachgewiesen wurde, waren die übrigen Moleküle in diesem Vergleich niedriger exprimiert. Allen diesen Molekülen konnte als *upstream* Regulator die Familie der Proteinkinasen C (PKC(s)) zugeordnet werden. Anhand der Wechselbeziehungen und der vorliegenden Expressionsdaten wurde für die PKC(s) eine niedrigere Expression in untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen abgeleitet. Die gleiche *upstream*-Analyse zeigte für trainierte im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen (DUK_LB vs oB, Abbildung 15a, unten), eine niedrigere Expression von PKC(s), FN1 und IGF2, so dass hier aus den Interaktionen der Moleküle eine verminderte Expression der übrigen abgebildeten DEGs postuliert wurde. Da die RNA-Level für IGF2 sowohl in untrainierten DUHLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, niedriger waren, konnte die Funktion als Schlüsselpotenziator für hohes Ausdauerleistungsvermögen und Training anhand dieser Abbildung erhärtet werden. Zudem konnten CD36, FABP4 und FAS als weitere Schlüsselpotenziatoren für hohes Ausdauerleistungsvermögen bestimmt werden (Abbildung 15b), da die RNA-Level dieser Gene in untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen niedriger waren.

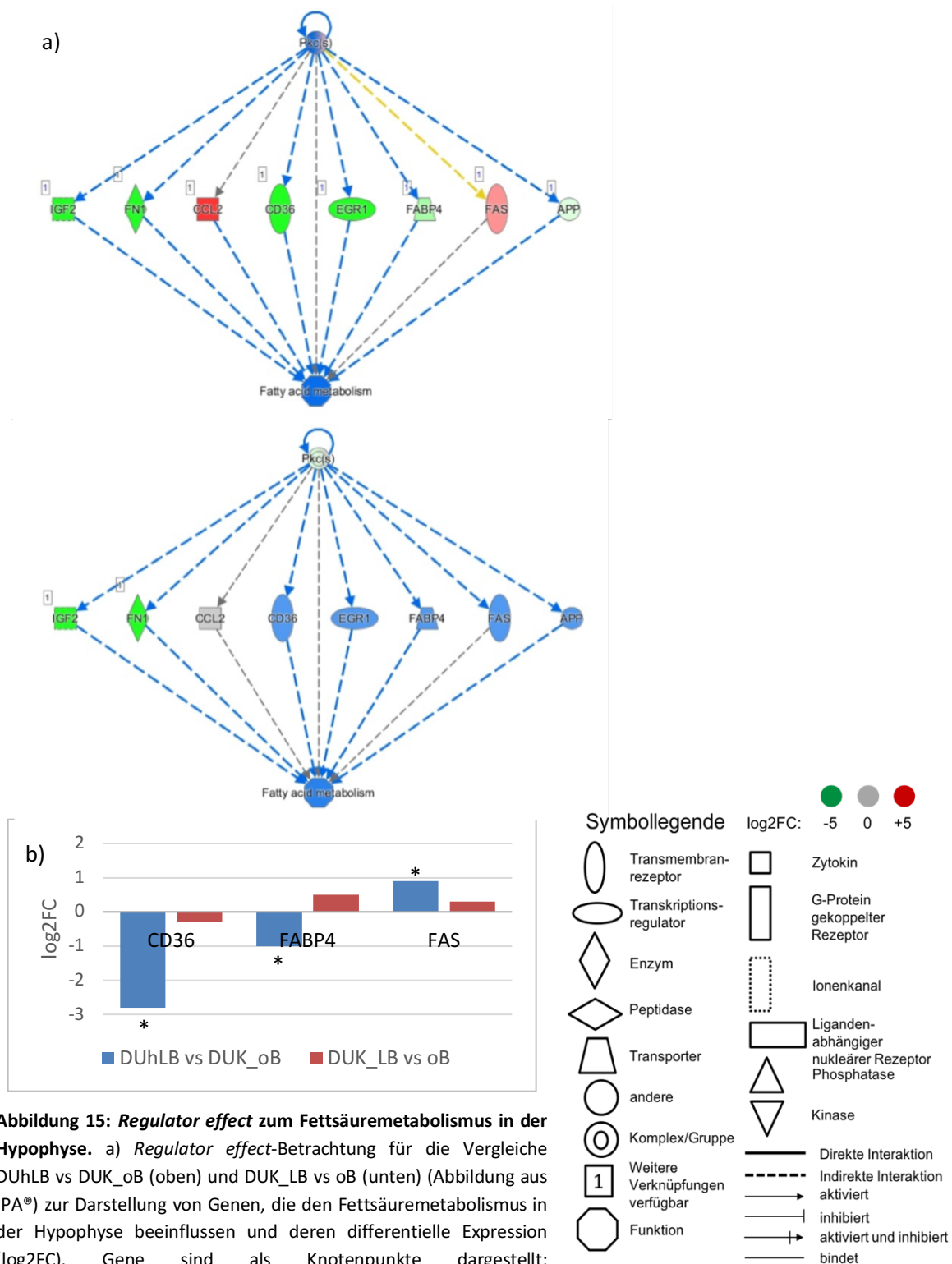


Abbildung 15: Regulator effect zum Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse.

a) *Regulator effect*-Betrachtung für die Vergleiche DUhLB vs DUK_oB (oben) und DUK_LB vs oB (unten) (Abbildung aus IPA®) zur Darstellung von Genen, die den Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse beeinflussen und deren differentielle Expression (log2FC). Gene sind als Knotenpunkte dargestellt:

Grün/rot/grau/blau niedrige/höhere/keine/prognostizierte niedrigere Expression in untrainierten DUhLB- im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB) bzw. trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). Die Pfeile stellen die Interaktion zwischen den Genen dar: blau: inhibiert das nachgeschaltete Molekül (Transkription, Genexpression oder Protein-DNA-Bindung), grau: kein Effekt prognostiziert, gelb: Unvereinbarkeit zwischen Zustand des Regulators und dem des nachgeschalteten Moleküls. b) Balkendiagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede (log2FC) ausgewählter Schlüsselgene aus a) (*: FDR<0,05) aus beiden Vergleichen. Niedrige RNA-Level von CD36 und FABP4 und erhöhte RNA-Level von FAS in der Hypophyse waren mit einem hohem Ausdauerleistungsvermögen assoziiert. So zeigten untrainierte DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen eine zweifach niedrigere (FABP4) bis knapp sechsfach niedrigere (CD36) bzw. fast doppelt so hohe Expression (FAS). Bzw. = beziehungsweise, DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = fold change, FDR = false discovery rate, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung, RNA = Ribonukleinsäure

4.4.3 Funktionelle Zuordnung von Genen zu lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen

Basierend auf wissenschaftlichen Erkenntnissen wurden die Expressionsanalysen genutzt, um DEGs der Hormonachsen der Hypophyse, welche unter körperlicher Aktivität lipolytisch wirken (GH, ACTH, OXT), zu betrachten. Damit sollten weitere differentiell exprimierte Schlüssel-moleküle in der Hypophyse aufgedeckt und analysiert werden. Über Literaturrecherche via PubMed (siehe 3.2.8) wurden Rezeptoren ausgemacht, die mit der Steuerung der Bildung und Sekretion der Hypophysenhormone assoziiert sind: GHRHR, GHSR, SSTR2, LEPR (alle GH-Achse), CRHR1, AVPR1B (beide ACTH-Achse), OXTR, CD38 (beide OXT-Achse). Außerdem wurde das Vorläuferpeptid POMC, welches durch PCSK1 in ACTH gespalten wird, sowie das mit diesem Vorgang assoziierte Inhibitorprotein CREB3L1 und das Inhibitorprotein der Konvertase PCSK1n (alle ACTH-Achse) mittels der Literaturrecherche ausgemacht. Zudem konnte TRPM2, welches in die Signaltransduktion der OXT-Achse in der Hypophyse eingebunden ist, als mögliches Schlüssel-molekül identifiziert werden. Die jeweiligen Literaturangaben sind in den Einleitungskapiteln 1.2.2.1, 1.2.2.3 und 1.2.2.6 zu finden.

Anhand der Genexpressionsunterschiede (Tabelle 19) fiel auf, dass im Zusammenhang mit hohem Ausdauerleistungsvermögen mehr Expressionsunterschiede quantifiziert werden konnten als im Zusammenhang mit dem Training. Während in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen sechs DEGs (AVPR1B, CREB3L1, CRHR1, GHSR, LEPR, SSTR2) gemessen werden konnten, waren es in der Hypophyse trainierter DUK-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen nur zwei DEGs (LEPR, PCSK1n). LEPR war dabei das einzige Gen, bei dem Expressionsunterschiede sowohl mit hohem Ausdauerleistungsvermögen, als auch mit Training assoziiert waren. Die differentielle Expression der meisten DEGs betrug $\log_2FC < 1$ und konnte somit als schwach eingeschätzt werden. Das Signifikanzniveau von $FDR = 0,05$ konnten insgesamt nur wenige der ausgewählten Gene erreichen. Auch für die Hormone GH und OXT konnten keine Expressionsunterschiede quantifiziert werden.

Tabelle 19: Expressionunterschiede für ausgewählte Gene, die funktionell zu lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen zugeordnet werden können

Gen	Funktion	Hypophysen- achse	DUhLB vs DUK_oB			DUK_LB vs oB		
			log2FC	mcpm	FDR	log2FC	mcpm	FDR
GH	Hormon	GH	-0,4	151207,7	0,07	0,4	200201,7	0,16
GHRHR	Rezeptor		-0,1	277,2	0,54	-0,2	274,3	0,43
GHSR	Rezeptor		-0,8	5,0	<0,05	-0,7	5,2	0,08
LEPR	Rezeptor		-1,3	5,2	<0,05	-1,0	5,6	<0,05
SSTR2	Rezeptor		-1,4	6,4	<0,05	-0,3	8,4	0,67
ACTH	Hormon	ACTH	<i>Dieses Gen konnte im RNAseq nicht gemappt werden.</i>					
AVPR1B	Rezeptor		0,6	9,8	<0,05	-0,2	7,3	0,56
CREB3L1	Inhibitor-protein		-0,9	29,7	<0,05	-0,1	36,8	0,60
CRHR1	Rezeptor		0,8	10,4	<0,05	0,4	12,5	0,15
PCSK1	Konvertase		-0,2	435,9	0,26	-0,3	427,7	0,14
PCSK1n	Inhibitor-protein		0,3	545,4	0,35	0,6	619,3	<0,05
POMC	Vorläufer-peptid		0,4	12951,7	0,61	0,4	12679,5	0,65
CD38	Rezeptor	OXT	0,2	9,9	0,54	-0,1	8,9	0,61
OXT	Hormon		0,5	3,5	0,66	1,5	5,5	0,11
OXTR	Rezeptor		0,7	4,8	0,23	0,6	2,2	0,37
TRPM2	Signaltrans- duktion		0,3	3,4	0,58	0,4	3,5	0,32

Genexpressionsunterschiede (log2FC) für ausgewählte Gene von langzeitlektierten DUhLB-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB) und trainierten Kontrollmäusen (DUK_LB vs oB) im Vergleich zu untrainierten Kontrollmäusen (niedriger/höher exprimiert log2FC<0/>0). Die Gene können funktionell den unter Einfluss körperlicher Aktivität lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen (GH, ACTH, OXT) zugeordnet werden. Die übrigen Hypophysenachsen (siehe Tabelle 1) wurden nicht berücksichtigt. Außerdem sind mcpm-Werte des jeweiligen Gens dargestellt, die einen Mittelwert der cpm aus den 16 Proben angeben, die in die Berechnungen des jeweiligen Vergleichs eingingen (siehe 3.2.5). Das Signifikanzniveau der Genexpressionsunterschiede lag bei FDR = 0,05; nicht-signifikante Expressionsunterschiede sind kursiv dargestellt. Die Gegenüberstellung der Genexpressionsunterschiede der zwei Vergleiche zeigt, dass das hohe Ausdauerleistungsvermögen mit mehr Expressionsunterschieden assoziiert war als das Training. So zeigten untrainierte DUhLB-Mäuse in der Hypophyse sechs Gene mit niedrigeren bzw. höheren RNA-Leveln als in untrainierten DUK-Mäusen, während es in der Hypophyse trainierter DUK-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen nur zwei Gene waren. ACTH = Adrenokortikotropes Hormon, cpm = *count per million*, DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, FDR = *false discovery rate*, GH = *growth hormone*, LB = Laufband, mcpm = *mean count per million*, NGS = *next generation sequencing*, oB = ohne Belastung, OXT = Oxytozin, RNA = Ribonukleinsäure, RNAseq = RNA-Sequenzierung. Gennamen siehe Abkürzungsverzeichnis

5 Diskussion

Sport ist ein wichtiger Faktor zur Prävention zahlreicher Erkrankungen. Insbesondere metabolischen Erkrankungen wie der Adipositas kann durch sportliche Aktivität vorgebeugt werden (Lear et al., 2017). Der Organismus benötigt während körperlicher Aktivität aufgrund des gesteigerten Leistungsumsatzes mehr Energie in Form von Nährstoffen. Da der Stoffwechsel eines Organismus unter der Kontrolle zahlreicher Gewebe und Organe steht, die miteinander über Botenstoffe und Substrate kommunizieren, ist er in der Lage auf innere und äußere Einflüsse zu reagieren. Einen solchen äußeren Einfluss stellt körperliche Aktivität bspw. Sport im Rahmen eines Ausdauertrainings dar. Aktuelle Forschungen konzentrieren sich auf eine Analyse des Stoffwechsels unter Trainingsbedingungen, um mögliche metabolische Anpassungen zu identifizieren, perspektivisch für Diagnostik und Therapien zu nutzen und letztendlich die Prävalenz und Mortalität von Stoffwechselerkrankungen zu senken. Neben bereits bekannten trainingsinduzierten Anpassungen in Organen wie Fettgewebe, Muskel oder Leber, welche mit erhöhter Lipolyse und Bereitstellung von freien FS zur Versorgung der Muskeln einhergehen, werden auch bei der Hypophyse, die als neuroendokrines Organ den Stoffwechsel beeinflussen kann, trainingsassoziierte Anpassungen vermutet (Cadegiani und Kater, 2019). Aktuelle Forschungen beschäftigen sich damit, welche Hormone der Hypophyse trainingsassoziiert vermehrt oder vermindert sekretiert werden und welchen Einfluss dies auf andere am Stoffwechsel beteiligte Organe hat. Vermutlich resultiert ein Ausdauertraining in einer Erhöhung der Sekretion lipolytisch-wirkender Hypophysenhormone, wie ACTH, GH und OXT. Dies dient der Bereitstellung von Energieträgern, während es zu einer verminderten Ausschüttung der Thyroid- und Gonaden-Hormone kommt (Anderson, 2019, Popovic et al., 2019, Jong et al., 2015).

Die Erkenntnisse zu funktionellen Anpassungen der Hypophyse an ein Ausdauertraining entstammen Studien mit Athleten und nicht-trainierten Kontrollen sowie Tierstudien und stützen sich vor allem auf Serum- und Speichelproben. Untersuchungen auf Transkriptomebene zur Analyse von Genexpressionsunterschieden wurden bisher weniger durchgeführt, da hierfür invasive Methoden zur Probengewinnung nötig sind. Die Untersuchung von Genexpressionsunterschieden kann aber Hinweise auf Anpassungen an das Training auf molekularer Ebene liefern, die für das Verständnis der genetischen Komponente der Bewegungsphysiologie wichtig sind (Bouchard et al., 2011). In bisherigen Studien wurde meist die gezielte RNA-Expression einzelner Gene, wie bspw. Rezeptoren von *releasing*- oder *inhibiting*-Hormonen, die auf die Sekretion von Hypophysenhormonen wirken, untersucht (Uribe et al., 2014, Park et al., 2005). Eine umfangreiche Analyse des gesamten Transkriptoms der Hypophyse im Zusammenhang mit einem Ausdauertraining ist bisher nicht bekannt. Mäuse der Dummerstorfer hoch-Laufband-Linie DUhLB, welche seit über 35 Jahren auf hohe Laufleistung gezüchtet wurden, wurden deshalb für eine solch umfangreiche Analyse genutzt. Durch die jahrelange Selektion wurde mit der DUhLB-Linie ein Mausmodell generiert, welches durch spezifische Stoffwechselanpassungen gekennzeichnet ist. Das DUhLB-Modell ist aktuell das am langfristigsten angelegte Mausmodell zur Ausdauerselektion weltweit (Swallow et al., 1998). Die Untersuchung des gesamten Transkriptoms der Hypophyse von Mäusen einer auf hohe Ausdauerleistung langzeitselektierten Mauslinie mit Betrachtung der Translation zur Situation beim Menschen stellt einen neuen Forschungsansatz dar. Die Beobachtung der Anpassungen der DUhLB-Mäuse unter Trainingseinfluss stellt ebenso einen neuen Untersuchungsaspekt dar. Zuvor wurde nur

der Einfluss von freiwilliger, moderater Bewegung untersucht (Brenmoehl et al., 2017, Brenmoehl et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden selektierte DUhLB- und nicht-selektierte Kontrollmäuse der Dummerstorfer Kontrolllinie DUK einem dreiwöchigen Trainingsprogramm auf einem Laufband unterzogen. Zur Referenz wurden zudem Mäuse beider Linien nicht trainiert. Im Rahmen einer Transkriptomanalyse wurden RNA-Proben aus der Hypophyse von jeweils acht DUhLB- und Kontrollmäusen, mit und ohne Training (vier Gruppen mit je acht Mäusen, n=32) entnommen, mittels RNAseq sequenziert und die Expressionsdaten anschließend bioinformatisch ausgewertet. Zur Analyse der Genexpressionsunterschiede wurden paarweise Vergleiche aus trainierten und untrainierten Tieren der jeweiligen Linie (Trainingsvergleiche, DUhLB_LB vs oB und DUK_LB vs oB) sowie Tiere beider Linien im Vergleich (Linienvergleiche, DUhLB vs DUK_oB und DUhLB vs DUK_LB) erstellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Unterschiede auf transkriptioneller Ebene in der Hypophyse von Mäusen, die mit einem Laufbandtraining assoziiert waren, zu analysieren. Dabei wurde untersucht, ob die Langzeitselektion nach hoher Laufleistung von DUhLB-Mäusen zu ähnlichen Expressionsunterschieden im Transkriptom führt wie das dreiwöchiges Laufbandtraining in nicht-selektierten Kontrollen. Der Fokus der funktionellen Analyse war daher auf den Vergleich der DEGs zwischen untrainierten DUhLB- und Kontrollmäusen (DUhLB vs DUK_oB) sowie für drei Wochen trainierten und untrainierten Kontrollmäusen (DUK_LB vs oB) gerichtet, um so Expressionsunterschiede, die mit hohem Ausdauerleistungsvermögen bzw. Training assoziiert waren, zu untersuchen.

5.1 Angewandte Methodik

Tiermodelle sind zur biomedizinischen Grundlagenforschung gut geeignet, da sie auch für schwer zugängliche Organe, wie die Hypophyse, Untersuchungen ermöglichen, die bei Menschen sonst nur mittels invasiver Probenentnahmen oder im Rahmen von Obduktionen bei Verstorbenen möglich wären. Insbesondere Mausmodelle eignen sich für die Grundlagenforschung gut, da die Tiere pflegeleicht sind, geringe Kosten für die Versorgung verursachen und sich schnell fortpflanzen. Die DUhLB-Mäuse sind aufgrund der Vermeidung von Inzucht während der jahrelangen Selektion genetisch heterogen (siehe 1.4.1). Aufgrund ihrer komplexen Genetik ist eine Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus den Experimenten auf andere Populationen, wie bspw. den Menschen, besser möglich als bei Inzuchtstämmen. Allerdings besteht wegen der genetischen Variabilität der Individuen keine Möglichkeit, die Experimente mit exakt den gleichen Grundvoraussetzungen zu wiederholen (Tuttle et al., 2018, Zuberi und Lutz, 2016). Außerdem bedingt die größere Rolle einzelner Individuen in Auszucht-Mausmodellen eine größere Varianz in den Daten (hier RNAseq). Das heißt, einzelne DEGs haben möglicherweise bei einzelnen Individuen eine größere Bedeutung als bei anderen. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit dieser Aspekt nicht berücksichtigt wurde, da hier Mittelwerte zur Untersuchung der Expressionsunterschiede in der Hypophyse der Mäuse erstellt wurden, stellt dies eine Schwachstelle der Studie dar. Zudem war die Anzahl der Tiere mit n=8 Mäusen pro Gruppe (vier Gruppen, insgesamt 32 Mäuse) sehr gering. Bei der Probenentnahme wurde

außerdem nicht auf die zirkardiane Rhythmik der Hormone der Hypophyse geachtet, was ebenfalls die Daten beeinflusst haben könnte.

Zur Sequenzierung wurde die Methodik des RNAseq, ein modernes NGS-Verfahren, verwendet. Neben dem Gebrauch in der Molekularbiologie wird RNAseq heute vor allem in der Krebsforschung und auch Krebsdiagnostik in der Medizin angewendet (Serrati et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde die RNAseq-Technologie genutzt, da sie einen hohen Durchlauf und somit die Analyse des gesamten Transkriptoms und mehrerer Proben gleichzeitig ermöglicht. Im Gegensatz zur Analyse mittels Mikroarrays, welche bspw. in den Kosten dem RNAseq überlegen ist, können mittels RNAseq außerdem bislang unbekannte oder seltene Transkripte nachgewiesen werden, alternative Spleißisoformen identifiziert und Allel-spezifische Genexpressionsanalysen durchgeführt werden (Supplitt et al., 2021, van der Kloet et al., 2020, Lowe et al., 2017). Die Qualitätskontrolle der RNAseq-Daten erfolgte über das Programm FastQC. Daten, deren mittlerer *Q-Score* <30 war oder deren Leselänge weniger als 30 bp betrug, wurden aufgrund mangelnder Qualität aussortiert. Für die Auswertung wurde das Programm edgeR genutzt. Rajkumar et al. empfehlen dieses Programm, da es im Vergleich zu anderen Auswertungsprogrammen die höchste Sensitivität im Bezug auf die Quantifizierung von DEGs aufweist (Rajkumar et al., 2015). Um Gene mit geringen *reads* herauszufiltern, wurden außerdem nur Gene verwendet, die >0,5 cpm aufwiesen und in mindestens vier *libraries* auftauchten. Die Berechnung der mcpm-Werte im Rahmen der funktionellen Interpretation der RNAseq-Daten zeigte jedoch, dass viele DEGs nur geringe Werte aufwiesen, was für eine geringe Expressionshöhe und eine hohe Wahrscheinlichkeit für Hintergrundrauschen spricht. Um möglichst viele zufällig entstandene Ergebnisse herauszufiltern, wurde bei der statistischen Bearbeitung der NGS-Daten ein *cut-off* der FDR bei 0,05 gesetzt.

Um die RNAseq-Daten stichprobenartig zu überprüfen, wurde anschließend eine Validierung einzelner Genexpressionsunterschiede durchgeführt. Hierfür wurde die qRT-PCR im Hochdurchsatzverfahren genutzt. Die moderne Fluidigm®-Technologie weist eine hohe Sensitivität auf (Rajkumar et al., 2015) und erlaubt eine Analyse mehrerer Proben gleichzeitig. Trotz lediglich stichprobenartiger Auswahl einer kleinen Menge an Genen für die Validierung kann davon ausgegangen werden, dass diese repräsentativ für die Gesamtheit des Transkriptoms ist (Leek et al., 2012). Es wurde dabei auf eine möglichst hohe Expression (\log_2FC) der DEGs im RNAseq geachtet. Um Fehlerquellen durch nicht-funktionale Primer so gering wie möglich zu halten, wurde im Vorfeld der Validierung eine Primertesting durchgeführt und die Effizienz der Primerkombinationen ermittelt (siehe 4.3.1). Die Genexpressionsunterschiede aus der qRT-PCR- und RNAseq-Messung wurden anschließend verglichen und eine Korrelation erstellt (siehe 4.3.2). Die Pearson'schen Korrelationskoeffizienten betrugen $r=0,65$ (DUhLB vs DUK_oB) und $r=0,88$ (DUK_LB vs oB). Nach Kundt et al. geben Beträge der Korrelationskoeffizienten zwischen 0,7 und 0,9 eine hohe Korrelation, Werte zwischen 0,5 und 0,7 eine mittlere Korrelation an (Kundt et al., 2016). Die Korrelationskoeffizienten zeigten somit, dass die technische Validierung mittels qRT-PCR in der Summe erfolgreich war und die NGS-Daten bestätigt werden konnten. In anderen aktuellen Arbeiten, in denen ebenfalls RNAseq-Daten durch qRT-PCR validiert wurden, konnten ähnlich hohe Korrelationskoeffizienten nachgewiesen werden (Aboshady et al., 2019, Han et al., 2019, Horodyska et al., 2018). Im Unterschied zu den genannten Studien, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Validierung einer viel größeren Anzahl an DEGs durchgeführt. Auch mit dieser hohen Anzahl wurden hohe und mittlere Korrelationskoeffizienten erreicht, was für eine erfolgreiche Validierung spricht. Expressionsunterschiede, die über die qRT-PCR-Messung nicht bestätigt werden konnten, wiesen

häufig sehr geringe Expressionswerte in der qRT-PCR-Messung auf. Hier sind Verzerrungen der Werte aufgrund unzureichender Amplifikation der *templates* oder zu geringer Expression der Gene wahrscheinlich. Rajkumar et al. schlugen zum Ausschluss falscher Ergebnisse aufgrund von sehr geringen Expressionswerten vor, einen *cut-off* des log2FC bei $<1,25$ bzw. $>0,8$ zu setzen (Rajkumar et al., 2015). Ein solcher *cut-off* könnte zu einer deutlich stringenteren Ergebnisdarstellung führen. Da die Expression der Gene in der qRT-PCR-Messung lediglich eine technische Validierung darstellt, beruhte die funktionelle Auswertung der Transkriptomdaten der Hypophyse der vorliegenden Arbeit auf den Daten aus der RNAseq. In der vorliegenden Arbeit werden Daten, die über RNAseq gewonnen wurden, der Einfachheit halber als NGS-Daten bezeichnet.

5.2 Funktionelle Analyse der Genexpressionsunterschiede in der Hypophyse von untrainierten DUhLB- und trainierten Kontrollmäusen

Die Darstellung der NGS-Daten unter einem festgesetzten Signifikanzniveau von $FDR = 0,05$ zeigte Unterschiede in der Anzahl der DEGs der jeweiligen paarweisen Vergleiche (siehe 4.2.1). Die hohen Zahlen an DEGs im Vergleich untrainierter Mäuse beider Linien (DUhLB vs DUK_oB, 1732 DEGs), welche die Assoziation mit hoher Ausdauerleistung beschreiben, deuten auf einen hohen Anteil an genetisch manifestierten Anpassungen in der Hypophyse der DUhLB-Mäuse infolge der jahrelangen Selektion hin. Beim Vergleich der Anzahl der DEGs der Mäuse innerhalb der jeweiligen Linie, der die Assoziation zum Training darstellt, werden die geringen trainings- und stärkeren linienspezifischen Unterschiede im RNA-Profil der Hypophyse von DUhLB-Mäusen bestätigt. Während die Zahl der DEGs der trainierten im Vergleich zu untrainierten DUhLB-Mäusen (DUhLB_LB vs oB) nur minimal ist (50 DEGs), zeigt der Vergleich der DUK-Mäuse (DUK_LB vs oB) eine wesentlich höhere Anzahl an DEGs (637 DEGs). In DUK-Mäusen hat somit das Training einen deutlicheren Einfluss auf die Anzahl der DEGs in der Hypophyse als in DUhLB-Mäusen.

Im nächsten Schritt wurden die DEGs untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUhLB vs DUK_oB) und die DEGs trainierter DUK-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB) verglichen (siehe 4.2.2). Dabei konnten 120 Gene quantifiziert werden, die sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, differentiell exprimiert waren. Das machte nur etwa 7% der in untrainierten DUhLB- im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen gemessenen Expressionsunterschiede aus. Die DEGs werden im Folgenden hinsichtlich der Funktion in der Hypophyse bezüglich hoher Ausdauerleistung und Training diskutiert.

Die Ergebnisse der DEG-Analyse fanden bereits Eingang in die Publikation Walz et al. in der Zeitschrift *Cells* (Walz et al., 2021). Auf der Grundlage der durch Massett et al. veröffentlichten genetischen Regionen, die mit Trainingserfolg assoziiert sind (Massett et al., 2009), konnten in DUhLB- und DUK-Mäusen mehrere Schlüsselgene identifiziert werden (Walz et al., 2021). Außerdem wurde anhand der Signalweganalyse gezeigt, dass nur in DUK-Mäusen die Proteinsynthese und die Energieversorgung in der Hypophyse im Zusammenhang mit dem Ausdauertraining hochreguliert waren (Walz et al., 2021).

5.2.1 *Solute carrier* Transporter

Ein Anteil von 11% (13 DEGs) der 120 DEGs bestand aus Genen, die für Transporter kodieren. Von 13 DEGs konnten elf den SLC-kodierenden Genen zugeordnet werden. Die SLC-Transporter sind eine Gruppe von Transmembranproteinen, von denen bisher über 400 Gene in über 60 Familien gelistet wurden (Schumann et al., 2020). Sie werden ubiquitär im Körper exprimiert, über 280 verschiedene Gene auch im Gehirn (Hu et al., 2019). Niedrige RNA-Level der elf für SLC-Transporter kodierenden Gene waren sowohl mit hohem Ausdauerleistungsvermögen als auch mit Training assoziiert. Die Expressionsverminderung in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen bezieht sich auf ein breites Spektrum an SLC-Transportern, die sehr unterschiedliche Moleküle transportieren, welche nicht nur einer Substratklasse zugeordnet werden können. Eine solch breite Expressionsverminderung einer Transportergruppe in Assoziation zu hoher Laufleistung bzw. Training in der Hypophyse ist bisher in der Literatur nicht beschrieben wurden.

Eine Ausnahme ist SLC2A3, der den Glukosetransporter 3 (GLUT3) kodiert und für die Glukoseaufnahme im Gehirn verantwortlich ist (Hu et al., 2019). Dieser war in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen auf RNA-Ebene höher exprimiert als in untrainierten DUK-Mäusen. In trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen konnte kein Expressionsunterschied gemessen werden. Glukose ist für das Gehirn ein obligatorisches Energiesubstrat; die Versorgung dessen ist abhängig von der Nutzbarkeit und Verfügbarkeit der Glukose (Magistretti und Allaman, 2015). Transporter und die verstoffwechselnden Enzyme bestimmen die Nutzbarkeit, da das Gehirn selbst nur vernachlässigbar geringe Glukosespeicher besitzt (Herbet et al., 2019). Da die Glukosetransporter im Gehirn immer gesättigt sind, erfolgt stets eine Expressionserhöhung dieser bei erhöhtem Glukosebedarf (Herbet et al., 2019). Unter hypoxischen und hypoglykämischen Bedingungen sowie in Krebszellen konnte bereits eine erhöhte Expression von SLC2A3 nachgewiesen werden, da unter diesen Umständen erhöhter Glukosebedarf besteht (Ziegler et al., 2020). Herbet et al. wiesen zudem eine erhöhte mRNA-Expression von SLC2A3 im Rattenhirn infolge des Einflusses verschiedener externer Stressoren, wie Nahrungsentzug, Isolation oder forciertem Schwimmen, nach (Herbet et al., 2019). Zudem wurde eine erhöhte mRNA-Expression von SLC2A3 nach dreiwöchigem Laufbandtraining im Gehirn von Mäusen gemessen (Dornbos et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse der Studien nicht bestätigt werden, da infolge des Trainings kein Expressionsunterschied von SLC2A3 in der Hypophyse von trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen quantifiziert werden konnte. Lediglich in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen konnte die Expressionserhöhung dieses Glukosetransporters quantifiziert werden. Ob dies im Zusammenhang mit der hohen Ausdauerlaufleistung steht oder dabei auch andere metabolische Einflüsse wie Hypoglykämie oder Hypoxie zur Expressionserhöhung von SLC2A3 geführt haben, sollte in Folgearbeiten anhand von Serumproben der gleichen Tiere weiter untersucht werden.

Aktuelle klinische Forschung beschäftigt sich mit der Frage, ob abnorme Glukosespiegel im Gehirn mit der Pathogenese von Alzheimer Erkrankung assoziiert sind. An et al. fanden heraus, dass geringere Proteinlevel von GLUT3 mit einem höheren Schweregrad an pathologischen Protein-Ablagerungen, die mit der Entstehung der Erkrankung zusammen hängen, assoziiert sind (An et al., 2018). Hochregulation von SLC2A3 auf RNA-Ebene in Assoziation zu hoher Ausdauerlaufleistung könnte demnach einen präventiven Effekt auf die Entstehung der Alzheimer Erkrankung haben.

In Phasen intensiver körperlicher Aktivität kann es dazu kommen, dass nicht ausreichend Glukose für den erhöhten Energiebedarf verfügbar ist. Um die ausreichende Versorgung des Gehirns dennoch zu gewährleisten, werden bspw. Ketonkörper als Energieträger genutzt (Puchalska und Crawford, 2017). Die Transporter für Ketonkörper SLC16A1 und SLC16A7 (Schumann et al., 2020) sind sowohl in untrainierten DUHLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, nicht differentiell exprimiert. Takimoto und Hamada untersuchten Proteinlevel von SLC16A1, SLC16A7 und Ketonkörpern in mehreren Hirnregionen nach einem einmaligen zweistündigen Laufbandtraining (Takimoto und Hamada, 2014). Im funktionell mit der Hypophyse verbundenen Hypothalamus wurden zwischen fünf und 24 Stunden nach dem Training erhöhte Proteinlevel von SLC16A7 gefunden, während sowohl SLC16A1-Proteinlevel als auch Level von dem Ketonkörper β -Hydroxybutyrat im Hypothalamus der Mäuse nicht verändert waren. Möglicherweise könnte der anteilige Widerspruch zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und denen von Takimoto und Hamada in der Art des Trainings liegen. Im Rahmen eines längerfristigen Trainings könnte sich die Hypophyse demnach an einen höheren Energiebedarf angepasst haben und wäre somit nicht mehr auf die Versorgung mit Ketonkörpern angewiesen, weswegen keine Expressionsunterschiede in DUHLB- und DUK-Mäusen quantifiziert werden konnten.

Eine SLC-Familie, die mit neuronalen Funktionen assoziiert ist, ist die SLC6-Familie, deren Funktion der Transport von GABA in die Präsynapse ist (Hu et al., 2019). In untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen konnten drei Gene, welche SLC6-Transporter kodieren, quantifiziert werden, die auf RNA-Ebene alle niedriger exprimiert waren: SLC6A1, SLC6A12, SLC6A13. Die beiden letzteren zeigten auch im Vergleich von trainierten zu untrainierten DUK-Mäusen eine Expressionsverminderung in der Hypophyse. Sowohl in Assoziation mit hoher Ausdauerlaufleistung als auch mit Training könnte demnach eine reduzierte Aufnahme von GABA in die Präsynapse stattfinden. Dem entgegen spricht eine Expressionserhöhung des SLC32A1 in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, welcher im Rahmen der Wiederaufnahme von GABA in die Präsynapse, für die Aufnahme von GABA in Vesikel verantwortlich ist (Juge et al., 2009). Die beschriebenen Expressionsunterschiede in der Hypophyse in Assoziation zu hoher Ausdauerlaufleistung und Training stellen ein neues Ergebnis dar, welches in der Literatur so noch nicht aufgezeigt worden ist. Außerdem war sowohl in untrainierten DUHLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen, jeweils im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, GABRA3, eine Untereinheit des ionotropen GABR an der Postsynapse, auf RNA-Ebene höher exprimiert. Darlington et al. konnten erhöhte RNA-Level von GABRA3 im Mausgehirn infolge freiwilligen Trainings im Laufrad nachweisen (Darlington et al., 2016). In untrainierten DUHLB-Mäusen waren darüber hinaus die RNA-Level einer weiteren Untereinheit (GABRG3) höher als in untrainierten DUK-Mäusen. Dies könnte auf eine verlängerte Signalübertragung an GABAergen Synapsen hindeuten. GABA-Rezeptoren werden im HVL von somatotropen, kortikotropen und gonadotropen Zellen exprimiert (Anderson und Mitchell, 1986). Eine orale Supplementation von GABA wirkt auf somatotrope Zellen stimulierend und steigert den GH-Serumspiegel (Cavagnini et al., 1980). Dies konnte auch bei GABA-Supplementation in den Anfangswochen eines Trainingsprogramms nachgewiesen werden (Sakashita et al., 2019). Eine verlängerte Signalübertragung an GABAergen Synapsen in der Hypophyse, sowohl in Assoziation zu hoher Ausdauerlaufleistung als auch zu Training, könnte mit höheren GH-Serumspiegeln einhergehen. Außerdem fanden Sakashita et al. heraus, dass eine tägliche GABA-Supplementation in Zusammenhang mit einem Trainingsprogramm bei mittelalten, untrainierten Männern zu erhöhter fettfreier Masse und damit vermutlich zu trainingsinduzierter Muskelhypertrophie führt (Sakashita et al., 2019). Da die DUHLB-Mäuse im Vergleich zu DUK-Mäusen

nicht durch erhöhte Muskelmassen charakterisiert sind (Brenmoehl et al., 2013), ist es notwendig, in Folgeexperimenten den Einfluss von GH auf Fett- und Muskelmasse in DUhLB-Mäusen zu untersuchen. Die entsprechenden Proben wurden gewonnen und sind im Fokus von Untersuchungen anderer Doktorarbeiten in der Arbeitsgruppe am FBN.

5.2.2 Transkriptionsfaktor Estrogenrezeptor 1 und dessen regulierte Gene

Das Gen ESR1, welches in untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen auf RNA-Ebene im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen niedriger exprimiert war (siehe 4.4.1), kodiert ER α , einen intrazellulären Transkriptionsfaktor, der zu den Östrogenrezeptoren gehört und in der Hypophyse exprimiert wird (Schreihöfer et al., 2000).

Ohde et al. untersuchten bereits den Serum-Östrogenspiegel in untrainierten DUhLB-Mäusen und fanden heraus, dass dieser im Vergleich zu Kontrollen verringert ist (Ohde et al., 2016b). Schreihöfer et al. untersuchten den Einfluss von Östrogen auf die Expression von ESR1 in der Hypophyse von Mäusen und fanden heraus, dass die ESR1-mRNA-Level durch Östrogen nicht beeinflussbar waren, während Östrogen die Proteinexpression des Rezeptors verringerte (Schreihöfer et al., 2000). Die hohe Ausdauerleistung der DUhLB-Mäuse ist nicht mit höheren Östrogenspiegeln oder höherer ESR1-RNA im Vergleich zu Kontrollen assoziiert und es fällt schwer, einen Zusammenhang zwischen Östrogenspiegeln und ESR1-Expression herzustellen. Es ist bekannt, dass Training Östrogen-Serumspiegel (Sato et al., 2016) und die RNA-Level von ESR1 im Gehirn (Darlington et al., 2016) erhöht. Auch dies ließ sich anhand der Expressionsunterschiede der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen.

In der funktionellen Analyse konnte eine zentrale Position des ESR1 in den Regulationsmechanismen in der Hypophyse aufgezeigt werden (siehe 4.4.1). ESR1 als Transkriptionsfaktor beeinflusst demnach in der Hypophyse der untrainierten DUhLB-Mäuse die Transkription zahlreicher weiterer Gene. Dyneine und Histone gehörten dabei zu den häufigsten Genen. Genaue Funktionen dieser Moleküle in der Hypophyse sind bisher nicht bekannt, was die funktionelle Interpretation der Ergebnisse erschwert. Ergänzend waren die RNA-Level des Transporters SLC13A4, ein Natrium/Anionen-Cotransporter mit Sulfat, und des Kaliumkanals KCNJ13 in untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen niedriger und damit in Zusammenhang mit hoher Ausdauerleistung und Training zu stellen. Beide werden durch ESR1 direkt beeinflusst. Sarvari et al. fanden bereits einen anderen Kaliumkanal sowie einige SLC-Transporter, die im Hippocampus von Ratten durch ESR1 reguliert waren (Sarvari et al., 2015). Informationen zu einer Assoziation der beiden Kanäle KCNJ13 und SLC13A4 mit Ausdauer oder Training sind in der Literatur bisher nicht verfügbar. Auch der durch Calcium aktivierte Chloridkanal ANO2 war in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen ESR1-abhängig höher exprimiert. ANO2 ist an Prozessen der olfaktorischen und photosensorischen Signaltransduktion beteiligt (Stephan et al., 2009). Eine genaue Rolle in der Hypophyse ist bisher unbekannt. Autoantikörper gegen ANO2 konnten im Serum von Patienten, die an Multipler Sklerose (MS) erkrankt sind, gefunden werden (Ayoglu et al., 2016). Eine immunhistochemische Untersuchung des Gehirns zeigte zudem eine erhöhte Expression von ANO2 in der Nähe bzw. direkt in MS-typischen Läsionen (Ayoglu et al., 2016). Dies legt die Grundlage für weitere Forschungen an Biomarkern und

autoimmunologischen Zielen für die Diagnostik und Therapie der MS. Die erhöhte Expression von ANO2 in der Hypophyse der DUhLB-Mäuse kann auf der Basis aktueller Erkenntnisse zum DUhLB-Mausmodell nicht mit der MS in Verbindung gebracht werden. Auffällig ist aber, dass in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen kein Expressionsunterschied von ANO2 quantifiziert werden konnte. Sportliche Aktivität von MS-Patienten kann zu verbesserter Lebensqualität, kardiorespiratorischer Fitness, muskulärer Stärke, Kognition und weniger Fatigue führen, Evidenz für einen Einfluss von Sport auf die Struktur des Gehirns gibt es jedoch bisher nicht (Halabchi et al., 2017). Weshalb ANO2-RNA-Level in der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen erhöht waren, kann somit nicht abschließend geklärt werden. Die Analyse der Expression von ANO2 sollte deshalb Bestandteil weiterer Forschungen, insbesondere des gesamten Gehirns der DUhLB-Mäuse, sein.

Östrogene haben über ESR1 im Zusammenspiel mit dem POU1F1-Gen, einem hypophysären Transkriptionsfaktor, Einfluss auf die Entwicklung der Hypophyse sowie die Hormonproduktion in somatotropen und laktotropen Zellen (Birla et al., 2019). POU1F1-RNA-Level waren in untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen niedriger als in untrainierten DUK-Mäusen. Die relativ geringe Expression der beiden Gene ESR1 und POU1F1 würde mit verringerten GH- und -PRL-Serumspiegeln einhergehen. Eine Assoziation von hoher Ausdauerleistung oder Training mit niedrigen POU1F1-RNA-Leveln ist bisher in der Literatur nicht bekannt.

5.2.3 Gene, die an Wachstumsprozessen beteiligt sind und in Assoziation zu *growth hormone* dargestellt werden

Im Wachstumsfaktor-assoziierten Geninteraktionsnetzwerk wurde GH mit Genen abgebildet, die funktionell vor allem mit Wachstumsprozessen in Verbindung gebracht werden können (siehe 4.4.1). Wachstum bedeutet eine Vermehrung der Masse und/oder Größe durch Hyperplasie oder Hypertrophie der Zellen eines biologischen Systems. Auffallend war eine einheitliche Expressionsverminderung von Wachstumsfaktoren wie EGR1, EGR2 oder IGF2 in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen. Bei trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen waren lediglich IGF2-RNA-Level verringert. IGF2 ist ein Effektor des GH, das heißt, es vermittelt als zwischengeschaltetes Peptid Funktionen von GH auf seine Zielorgane (Salmon und Daughaday, 1957). Das bevorzugt während der Embryonal- und Fetalperiode ubiquitär vorkommende IGF2 wird im adulten Organismus in Leber und zentralem Nervensystem exprimiert und ins Serum sekretiert. IGF2 reguliert prä- und postnatal Proliferation, Wachstum, Migration, Differenzierung und Überleben von Zellen (Bergman et al., 2013). Tiere, die Mutationen im IGF2-Gen hatten, wiesen kleinere Körpergrößen auf als Tiere mit nicht-mutiertem Gen. Diese Veränderungen im Gen können auch erblich weitergegeben werden, jedoch nur durch das paternale Allel, da das IGF2-Gen einer genetischen Prägung (*imprinting*) unterliegt (Begemann et al., 2015). Es ist möglich, dass auch im DUhLB-Modell die Expressionsunterschiede von IGF2 über die paternale Selektion der DUhLB-Linie weitergegeben wurden. IGF2 hat zudem einen Einfluss auf das postnatale Wachstum von Skelettmuskeln, so dass eine IGF2-Überexpression in erhöhter Skelettmuskelmasse sowie gesteigerter fettfreier Masse resultiert (Younis et al., 2018). Ein Einfluss von IGF2 auf das Muskelwachstum von DUhLB-Mäusen wird als gering eingeschätzt, da bisherige Ergebnisse die Ursache der hohen Laufleistung eher in den Anpassungen des Energiestoffwechsels als in der

funktionalen Umgestaltung des Muskels sehen (Brenmoehl et al., 2015, Brenmoehl et al., 2013). Um die Rolle des Muskels im DUhLB-Modell genauer zu untersuchen, finden derzeit Arbeiten am FBN Dummerstorf statt.

Des Weiteren beschäftigt sich aktuelle klinische Forschung mit der Modulation des IGF-Systems im Rahmen der Behandlung neurologischer Erkrankungen. Bspw. konnte bei Untersuchungen von MS-Patienten nachgewiesen werden, dass nach der intrathekalen Gabe des Steroids Triamcinolon-Acetonid zur Behandlung der MS das Verhältnis aus IGF2 und IGF-Bindungsprotein 2 und 3 im Liquor verringert war (Hoefflich et al., 2020). Dies lässt auf eine Regulation der Bioaktivität von IGF2 nach Gabe von Triamcinolon-Acetonid bei MS-Patienten und damit eine geringere entzündliche Aktivität schließen.

Da IGF2 in die GH-Achse eingebunden ist und im Rahmen von körperlicher Aktivität erhöhte GH-Serumspiegel gemessen werden konnten (siehe 1.2.3), suggeriert dies erhöhte IGF2-Serumspiegel infolge von Training. Dies konnte auch schon bei Frauen, die ein kombiniertes Ausdauer- und Widerstandstraining absolvierten, nachgewiesen werden (Han und So, 2016). Ergebnisse zur trainingsassoziierten IGF2-Expression in der Hypophyse liegen allerdings bisher in der Literatur nicht vor, so dass die verminderte IGF2-Expression, die eher mit niedrigen GH-Spiegeln einher gehen würde, in Assoziation zum Ausdauertraining eine neue Erkenntnis darstellt.

SPHK1, welches mit IGF2 interagiert, war sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen auf RNA-Ebene niedriger exprimiert. SPHK1 ist eine von zwei Isoformen der Sphingosinkinasen, die Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphorylieren. Bryan et al. beschrieben die neuronale Expression von SPHK1 und S1P und die Funktion von S1P als Wachstumsfaktor, welcher Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben sichert (Bryan et al., 2008). Eine reduzierte mRNA-Expression und Aktivität von SPHK1 im Mausgehirn ist assoziiert mit der Alzheimer Erkrankung (Lee et al., 2018). In aktuellen Forschungsprojekten wird nach Möglichkeiten gesucht, die Expression von SPHK1 zu erhöhen und daraus folgend die entzündliche Aktivität durch Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten zu verringern (Kim et al., 2019). Eine Expressionsverminderung in der Hypophyse im Zusammenhang mit hoher Ausdauerleistung und Training wurde bisher in der Literatur nicht diskutiert.

Auch die RNA-Level der Wachstumsfaktoren EGR1 und EGR2, welche zu einer Gruppe aus vier Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren gehören (Bouchoucha et al., 2013), waren in untrainierten DUhLB-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen vermindert. EGR2 wird vor allem in somatotropen Zellen exprimiert und ein KO zeigt sich in einer Hypoplasie des HVL sowie einem Funktionsverlust der GH-produzierenden Zellen und daraus resultierenden geringeren GH-Serumspiegeln (Bouchoucha et al., 2013). Løtvedt et al. untersuchten den Einfluss von Stress auf die Expression verschiedener Gene in Hühnern, unter anderem auf EGR1, und fanden auch eine verminderte Expression von EGR1 in der Hypophyse (Løtvedt et al., 2017). Die Expression von EGR1 steht unter dem Einfluss von GnRH aus dem Hypothalamus und steuert selbst die Bildung und Sekretion von LH aus der Hypophyse (Burger et al., 2009, Tremblay und Drouin, 1999). Wie Ohde et al. zeigten, sind die Serumlevel von Testosteron, welches infolge einer Stimulation durch LH in Leydig-Zellen im Hoden gebildet wird, in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu Kontrollen vermindert (Ohde et al., 2016b). Verbindet man dies, könnte durch die Expressionsverminderung des EGR1 eine reduzierte Sekretion von LH postuliert werden, was in geringeren Serum-Testosteronspiegeln resultieren würde. Da der Körper unter Stress keinen Wert auf Reproduktion legt, sondern eher die katabolen Hormonspiegel erhöht

sind (Anderson, 2019), könnte die mögliche Abwärtsregulation der Hypophysen-Gonaden-Achse, die nur in DUHLB-Mäusen auftritt, auf eine Anpassungsmechanismus in der Hypophyse der DUHLB-Mäuse hindeuten, der in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung entstanden ist. Auch Løtvedt et al. diskutierten als Ursache für die stressinduzierte Expressionsverminderung von EGR1 in der Hypophyse der Hühner den reduzierten Fokus auf die Reproduktion unter akuten Stressbedingungen (Løtvedt et al., 2017). Im Rahmen von Trainingsstudien konnten außerdem erhöhte EGR1-Proteinlevel im Mausgehirn nach Akrobatik-Training über mehrere Wochen (Salame et al., 2016) sowie niedrigere EGR2-RNA-Level im Mausgehirn nach freiwilliger körperlicher Aktivität im Laufrad gemessen werden (Darlington et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte nur in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung in untrainierten DUHLB- relativ zu untrainierten DUK-Mäusen ein Expressionsunterschied auf RNA-Ebene quantifiziert werden. Eine Bestätigung von Ergebnissen bekannter Studien war somit nicht möglich.

Im Rahmen des Geninteraktionsnetzwerkes zur NFκB-Regulation wurde mit SFRP1 ein weiteres Gen dargestellt (siehe 4.4.1), dass mit dem Zellwachstum in Verbindung gebracht werden kann. SFRP1, als Inhibitor des WNT-Signalwegs, hat eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation und wirkt proapoptotisch (Kim et al., 2017). Eine vergleichsweise niedrige Expression, wie sie auch in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen vorliegt, wurde bereits in mehreren Tumorzelltypen, bspw. Mamma-, Kolon-, Prostata- oder Nierenzellkarzinom, nachgewiesen und resultiert in erhöhtem Zellwachstum (Baharudin et al., 2020). SFRP1 wird außerdem in Adipozyten exprimiert und ist im Fettgewebe adipöser Menschen erhöht (Lagathu et al., 2010). Kim et al. untersuchten den Serumspiegel von SFRP1 nach einem zwölfwöchigen Training bei Patienten mit Mammakarzinom und fanden eine Verminderung dessen (Kim et al., 2017). Sie interpretierten diese Expressionsverminderung in Zusammenhang mit verminderter Fettmasse und Körperfettanteile als Effekt des Trainings und diskutierten SFRP1 als Biomarker für metabolische Gesundheit bei Tumorpatienten. Die verminderte Expression von SFRP1 in Assoziation mit Training und hoher Ausdauerleistung in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit könnte auch in Zusammenhang mit besserer metabolischer Gesundheit bzw. verminderter Adipogenese stehen. Um diese Vermutung zu festigen, sollten in Folgeexperimenten SFRP1-Serumspiegel in DUHLB- und DUK-Mäusen bestimmt werden.

5.2.4 Gene, die funktionell zur *growth hormone*-Achse zugeordnet werden können

Die bisher diskutierten Ergebnisse zu den Schlüsselmolekülen ESR1, POU1F1, IGF2 und EGR2 (siehe 5.2.2 und 5.2.3), deuten auf eine Herunterregulation der lipolytisch-wirkenden GH-Achse in untrainierten DUHLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen hin. Dies würde im Widerspruch zur aktuellen Studienlage stehen, welche eher eine Erhöhung der lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen unter Ausdaueraktivität postuliert (siehe 1.2.3). Im Folgenden wird daher die Expression von Genen, die funktionell zur GH-Achse zugeordnet werden können, diskutiert.

GH wird bei Ausdaueraktivität vermehrt sekretiert, um eine Versorgung mit FS zu gewährleisten. Dabei beeinflusst GH die Lipolyse über eine Aktivierung der hormonsensitiven Lipase (HSL) und Adipotriglyzeridlipase im Fettgewebe (Bergan-Roller und Sheridan, 2018). Eine erhöhte

Konzentration der HSL als mögliche Folge eines GH-Einflusses konnte im subkutanen Fettgewebe der DUhLB-Mäuse relativ zu DUK-Mäusen bereits nachgewiesen werden (Brenmoehl et al., 2015).

Zur Untersuchung der GH-Sekretion in der Hypophyse wurden die Expressionswerte der Rezeptoren von GH-*releasing* und -*inhibiting*-Hormonen betrachtet (siehe 4.4.3). GHSR-RNA-Level waren in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen vermindert, GHRHR war weder in untrainierten DUhLB- noch in trainierten DUK-Mäusen differentiell exprimiert. Mutationen in den GHRHR- und GHSR-Genen können in niedrigen GH-Spiegeln resultieren (Wit et al., 2016). Die Expressionsverminderung von GHSR könnte somit mit niedrigen GH-Spiegeln assoziiert sein. GHSR-null Mäuse zeigten außerdem eine geringere Ausdauerleistung als Wildtyp-GHSR-Mäuse (Mani et al., 2018). Dies kann im DUhLB-Mausmodell nicht bestätigt werden, da trotz geringerer RNA-Level des Rezeptors im Vergleich zu DUK-Mäusen, DUhLB-Mäuse die höhere Ausdauerleistung zeigten (Brenmoehl et al., 2013). Des Weiteren deutet eine deutliche Expressionsverminderung des SSTR2, einem der Hauptrezeptoren für Somatostatin (Ben-Shlomo und Melmed, 2010), in der Hypophyse der untrainierten DUhLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen ebenso auf geringe GH-Serumspiegel hin. SSTR2 wird bei hohen GH-Spiegeln zur Antagonisierung aus einem intrazellulären Kompartiment an die Zelloberfläche verlagert und kann damit einen höheren Einfluss von Somatostatin ermöglichen (Alshafie et al., 2020), was mit einer Inhibition der GH-Ausschüttung einhergehen könnte. Die Expressionsverminderung in den DUhLB-Mäusen könnte demnach eher für niedrige GH-Spiegel sprechen, da keine Antagonisierung durch vermehrte Expression von SSTR2 nötig ist. Bei trainierten DUK-Mäusen konnte kein Expressionsunterschied für SSTR2 quantifiziert werden. Auch Zanjani et al. konnten im Rahmen eines zweiwöchigen Ausdauertrainings keinen Expressionsunterschied von SSTR2 messen (Zanjani et al., 2019). Da auch GHRHR und GHSR in trainierten DUK-Mäusen nicht differentiell exprimiert waren, weist dies darauf hin, dass das Training die Genexpression von Rezeptoren von *releasing*- und *inhibiting*-Hormonen von GH in der Hypophyse nicht beeinflusst.

Der Leptinrezeptor LEPR war in der vorliegenden Arbeit das einzige Gen, von den Genen, die funktionell zu lipolytisch-wirkenden Hypophysenhachsen zugeordnet wurden, welches sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen differentiell exprimiert war (siehe 4.4.3). In Metaanalysen und klinischen Studien konnten verminderte Serumspiegel des Adipokins Leptin nach sportlicher Aktivität, sowohl nach mehrwöchigem Training als auch nach einer *session*, detektiert werden (Becic et al., 2018, Yu et al., 2017, Voss et al., 2016). Die verminderten Leptinspiegel, resultierend aus körperlicher Aktivität, könnten zum einen mit einer Abnahme der Fettmasse durch den Sport und daraus folgender geringerer Leptin-Ausschüttung und zum anderen durch eine höhere Leptinsensitivität des Organismus entstehen. Andere Studien beschrieben keine Änderung der Leptinserumspiegel nach einer *session*, was zu der Annahme führte, dass individuelle Konstitutionen und Trainingsintensität einen Einfluss auf die Leptinserumspiegel haben (Hakimi und Ali-Mohammadi, 2019). Die Leptinserumspiegel in trainierten DUhLB-Mäusen sollten in Nachfolgeexperimenten bestimmt werden. Es lässt sich auch hier eine Verminderung der Leptinspiegel in Folge der Aktivität vermuten, da die DUhLB-Mäuse durch starke Fettmobilisation während Ausdauersports gekennzeichnet sind (Brenmoehl et al., 2015). Der von den somatotropen Zellen im HVL exprimierte LEPR war sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen vermindert exprimiert. Leight et al. fanden im Rahmen eines vierwöchigen Trainings keinen Expressionsunterschied des LEPR im Hypothalamus von Mäusen (Leigh et al., 2020). Da

Hypothalamus und Hypophyse funktionell eng miteinander verknüpft sind, impliziert dies einen Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Ruegsegger et al. beschrieben hingegen niedrigere LEPR-Level im Gehirn von Mäusen, die eine hohe freiwillige Aktivität im Laufrad besaßen (Ruegsegger et al., 2017), was wiederum durch die Expressionsverminderung in Assoziation zum Training in der vorliegenden Arbeit bestätigt wird. In somatotropen LEPR-KO-Mäusen konnten verminderte GH-mRNA- und GH-Protein-Level in der Hypophyse detektiert werden (Allensworth-James et al., 2018, Odle et al., 2016). In weiblichen Mäusen konnte dabei im Zusammenhang mit dem LEPR-KO auch eine verminderte Expression von POU1F1 (siehe 5.2.2), der die Transkription von GH-mRNA stimuliert, beobachtet werden (Allensworth-James et al., 2018). Die verminderte LEPR-Expression in untrainierten DUHLB- und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen könnte folglich mit verminderten GH-Serumspiegeln einhergehen. Auch die verminderte Expression des POU1F1-Gens in untrainierten DUHLB- und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen würde sich in dieses Bild einfügen.

Somit deutet die Analyse von Genen, die funktionell der GH-Achse zugeordnet werden können, auf eine Herunterregulation der GH-Achse hin. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der Dauer des Ausdauertrainings, welches im hier durchgeführten Trainingsexperiment zwar regelmäßig fünf Mal pro Woche stattfand, aber nur 30 Minuten (DUHLB) bzw. knapp 15 Minuten (DUK) pro Tag dauerte. Auch Nindl et al. konnten erst nach einer längeren Dauer des Trainings von zwei Stunden eine Erhöhung der GH-Sekretion bei Männern messen (Nindl et al., 2014). Anhand der GH-RNA-Level in der Hypophyse von untrainierten DUHLB- und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen kann die Herunterregulation der GH-Achse nicht bestätigt werden, da GH nicht als differentiell exprimiert identifiziert werden konnte. Ob GH im Serum von DUHLB- und DUK-Mäusen erniedrigt ist, sollte in weiterführenden Versuchen, bspw. durch Massenspektrometrie, analysiert werden. Hierfür könnten zur differenzierten Analyse auch longitudinal Serumproben vor und nach Einzelläufen entnommen werden, um akute Hormonveränderungen zu detektieren.

5.2.5 Gene, die am Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse beteiligt sind

Im Wachstumsfaktor-assoziierten Geninteraktionsnetzwerk waren außerdem Moleküle angeordnet, welche eine Regulation des Fettstoffwechsels in der Hypophyse anzeigen (siehe 4.4.1). CD36- und FABP4-RNA-Level waren in untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen vermindert. Die Expression von FABP4 wurde bisher vor allem im Fettgewebe beschrieben. Dort fungiert es als Transportprotein von FS zwischen den Zellorganellen. Zudem wirkt es als Adipokin und dient zur Kommunikation zwischen Fettgewebe und anderen am Stoffwechsel beteiligten Organen (Prentice et al., 2019). FABP4 ist außerdem an der Versorgung der Muskeln mit FS beteiligt. Ein FABP4-KO resultiert in einer geringeren, nicht-ausreichenden Versorgung der Muskeln mit FS während des Ausdauertrainings und somit einer reduzierten Ausdauerleistung (Iso et al., 2019). Die niedrige Expression von FABP4 in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen würde somit eher eine geringe Ausdauerleistung der Mäuse implizieren. Da DUHLB-Mäuse aber durch hohe Ausdauerleistung gekennzeichnet sind, scheint die FABP4-Regulation in der Hypophyse unabhängig von der Regulation übriger Organe, wie des Muskels, zu sein. Der FABP4-Serumspiegel korreliert positiv mit der katecholaminabhängigen Lipolyse im Fettgewebe. Unter körperlicher Aktivität steigen die Serumspiegel von FABP4 an, da

trainingsassoziiert mehr Katecholamine freigesetzt werden und die Lipolyse gesteigert wird (Iso et al., 2017). Gleichzeitig ist bekannt, dass FABP4-Serumspiegel positiv mit immunometabolischen Krankheiten wie Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 sowie kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose korrelieren und bei Adipositas erhöht sind, während FABP4-KO Mäuse vor diesen Krankheiten geschützt sind (Furuhashi, 2019, Trojnar et al., 2019). Dies wird wahrscheinlich über eine Inhibition von PPAR γ , welcher für die Differenzierung von Adipozyten sowie eine gesteigerte FS-Aufnahme und eine gesteigerte Insulinsensitivität verantwortlich ist, vermittelt (Cabia et al., 2016). Der Verlust von PPAR γ resultiert in höherer Insulinresistenz und damit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 sowie vermehrter Adipositas (Garin-Shkolnik et al., 2014). In Folgeexperimenten sollten Serumspiegel sowie die Expression von FABP4 in Fettgewebe und Muskeln der DUHLB-Mäuse untersucht werden. Über eine Funktion des FABP4 in der Hypophyse ist bisher noch nichts bekannt. Eine Expressionsverminderung impliziert aber einen verminderten FS-Transport innerhalb der Zellen und daraus folgend einem verringerten Fettstoffwechsel in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen.

CD36 wird vor allem im Muskel exprimiert und fungiert dort als Transportprotein für FS über die Zellmembran. In Vögeln konnte außerdem eine hohe spezifische Expression von CD36 unter anderem in der Hypophyse nachgewiesen werden (Wang et al., 2016). Die Expression von CD36 wird durch körperliche Aktivität beeinflusst. Kim und Lim konnten in einem vierwöchigen Laufbandtraining eine erhöhte Expression von CD36 in Muskelzellen von Mäusen detektieren, was mit einer erhöhten Gesamtfettoxidation sowie gesteigerter Ausdauerleistung korrelierte (Kim und Lim, 2016). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Expression von CD36 als FS-Transporter im Muskel wichtig für die Verwertung der FS als Energiequelle während eines Ausdauertrainings ist. In NGS-Daten von Muskelproben der DUHLB-Mäuse konnte allerdings keine erhöhte Expression von CD36 nachgewiesen werden. Auch ein dreiwöchiges Training führte in Kontrollmäusen zu keiner Erhöhung der muskulären Expression von CD36 (Dr. J. Brenmoehl, persönliche Mitteilung). Die metabolischen Anpassungen der DUHLB-Mäuse, hin zur Mobilisation von Fettdepots unter körperlicher Aktivität zur Versorgung der Muskeln mit freien FS, scheint demnach anderen Regulationsmechanismen zu unterliegen. Genauere Analysen der Genexpressionsunterschiede in Muskelproben der DUHLB-Mäuse mit und ohne Training finden derzeit am FBN Dummerstorf statt und sollen hier nicht weiter ausgeführt werden. CD36 wird bei hohen Östrogenspiegeln im Muskel vermehrt exprimiert (Oosthuyse und Bosch, 2010). Nach Ohde et al. wurden in untrainierten DUHLB-Mäusen signifikant verringerte Serum-Östrogenspiegel detektiert (Ohde et al., 2016b), womit die Expressionsverminderung von CD36 im Zusammenhang stehen könnte. Zhang et al. vermuten eine Korrelation der Expressionsverteilung von CD36 und der Funktion der Zellen. Zellen, die FS metabolisieren, speichern, transportieren oder sekretieren, weisen eine hohe Expression von CD36 auf (Zhang et al., 2003). Vergleichend mit den vorliegenden Genexpressionsunterschieden deutet dies darauf hin, dass FS-Aufnahme, -metabolismus und -speicherung in der Hypophyse der untrainierten DUHLB-Mäuse im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen verringert sind.

FAS-RNA-Level waren in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung erhöht. In der *upstream*-Regulator-Analyse zum Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse wurden PKCs dargestellt, die unter anderem CD36, FABP4, IGF2, EGR1 und FAS direkt regulieren (siehe 4.4.2). FAS gehört zur Gruppe der Tumornekrosefaktoren und induziert die Zellapoptose. Eine Inhibition der PKCs geht mit einer Blockade der FAS-induzierten Apoptose einher (Wang et al., 1998). Das würde bedeuten, dass bei einer verminderten Expression von PKCs auch eine niedrigere Expression von FAS resultieren sollte.

Kontrovers dazu ist die erhöhte Expression von FAS in der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen bei niedriger exprimierten PKCs. Die Expressionserhöhung von FAS impliziert daher weitere Faktoren, die FAS regulieren. In Assoziation zum dreiwöchigen Training konnte keine differentielle Expression von FAS gemessen werden. Lin et al. fanden hingegen erhöhte FAS/FAS-Liganden-Level im Hippocampus von Ratten nach einem zwölfwöchigen Schwimmtraining (Lin et al., 2020). Somit konnten die vorliegenden Ergebnisse bisherige Studienergebnisse nicht bestätigen. Möglicherweise war die Dauer des dreiwöchigen Laufbandtrainings zu kurz, um mit Expressionsunterschieden im FAS-Gen assoziiert zu sein.

In Abhängigkeit von den Molekülen IGF2, FN1, CCL2, CD36, EGR1, FABP4, FAS und APP wurde in der *upstream*-Regulator-Analyse der FS-Metabolismus der Hypophyse in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen als herunterreguliert angesehen (siehe 4.4.2). Auch in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen wurde diese Herunterregulation postuliert. Auch für die FS-Transporter, SLC27A1 und SLC27A4 (Mitchell et al., 2011), konnte in untrainierten DUhLB- und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen keine differentielle Expression gemessen werden (siehe 4.2.2). Dies impliziert eine untergeordnete Rolle der Aufnahme und Verstoffwechslung von FS in der Hypophyse von DUhLB- und Kontrollmäusen.

5.2.6 Gene, die funktionell zur Adrenokortikotropes Hormon-Achse zugeordnet werden können

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch die Genexpressionsunterschiede von Genen, die funktionell der ACTH-Achse zugeordnet werden können, in der Hypophyse der DUhLB- und DUK-Mäuse gemessen (siehe 4.4.3). Sowohl CRHR1- als auch AVPR1B-RNA-Level, zwei Rezeptoren für *releasing*-Hormone für die ACTH-Sekretion, waren in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen höher exprimiert. In trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen konnte keine differentielle Expression gemessen werden. Über beide Rezeptoren wird die basale und die stressinduzierte ACTH-Ausschüttung vermittelt, resultierend in geringeren ACTH-Serumspiegeln bei Verlust der Rezeptorfunktion (Ramos et al., 2016). Um die Regulation der ACTH-Synthese zu betrachten, wurden die Genexpressionsunterschiede des Prekursors POMC, der Konvertase PCSK1, die POMC in ACTH umwandelt, und ihres Transkriptionsfaktors CREB3L1 sowie des Inhibitorproteins der Konvertase PCSK1n analysiert. CREB3L1-Transkripte zeigten eine Expressionsverminderung in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen, PCSK1n eine Expressionserhöhung in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen. Bei den übrigen Genen konnte kein signifikanter Expressionsunterschied nachgewiesen werden. Das ACTH-Gen konnte mittels RNAseq in der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen nicht gemappt werden.

Das Hormon ACTH aus der Hypophyse stimuliert die Sekretion der Glukokortikoide aus der Nebennierenrinde. Diese gelten als Stresshormone und induzieren die Glukoneogenese und Lipolyse, führen aber auch zu erhöhter Insulinresistenz und wirken appetitanregend. ACTH hat selbst lipolytische Effekte und steigert das *browning* im weißen Fettgewebe (siehe 1.2.2.3). Die erhöhte Expression der Rezeptoren der *releasing*-Hormone CRHR1 und AVPR1B lässt eine Hochregulation der ACTH-Achse in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung vermuten. Cassarino et al. untersuchten den Einfluss einer CRH-Behandlung auf menschliche kortikotrope Zellen in der Hypophyse und

zeigten, dass es zwar eine Abhängigkeit der POMC-Expression von CRH, aber keine Korrelation zwischen POMC- und ACTH-Expression gibt (Cassarino et al., 2017). Außerdem zeigten sie, dass die CRHR1-Expression nicht mit der Antwort auf den CRH-Spiegel assoziiert war (Cassarino et al., 2017). Dies würde bedeuten, dass zwischen CRH-Serumspiegeln und erhöhter CRHR1-Expression in den DUHLB-Mäusen keine Korrelation vorliegt. In weiterführenden Experimenten sollte neben dem ACTH- daher auch unbedingt der CRH-Serumspiegel bestimmt werden, um die NGS-Daten besser einordnen zu können. Da außerdem für POMC keine differentielle Expression in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen quantifiziert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die Expressionserhöhung von CRHR1 anderen Einflüssen unterliegt. Harno et al. führten an, dass erst eine Langzeitstimulation mit CRH im HVL zu einer verstärkten Transkription des POMC-Gens führt (Harno et al., 2018). Dies könnte ein Hinweis sein, dass die CRH-Spiegel in DUHLB- und Kontrollmäusen nicht langfristig erhöht waren, sondern nur eine kurzfristige Stimulation vorlag. Leigh et al. konnten im Rahmen eines vierwöchigen Laufbandtrainings auch keine Expressionsunterschiede von POMC und CRH im Gehirn von Ratten messen (Leigh et al., 2020), was wiederum die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Die relativ niedrige Expression von CREB3L1 sowie keine differentielle Expression übriger Gene deuten auch nicht auf eine erhöhte Stimulation der Bildung und Sekretion von ACTH in der Hypophyse der untrainierten DUHLB-Mäuse hin. Da in den trainierten DUK-Mäusen außer PCSK1n keine differentielle Expression der betrachteten Achsen-assoziierten Gene gemessen werden konnte, scheint eine Hochregulation der ACTH-Achse der Hypophyse auch trainingsassoziiert unwahrscheinlich. Allerdings beschreiben auch Darlington et al. erhöhte Level von PCSK1n im Gehirn von Mäusen nach freiwilliger körperlicher Aktivität im Laufrad (Darlington et al., 2016). Die Ergebnisse legen nahe, dass einzelne Gene, auch unabhängig von der gesamten Hypophysen-Achse, trainingsassoziiert exprimiert werden können.

Kortikosteronmessungen im Serum von untrainierten DUHLB-Mäusen relativ zu Kontrollmäusen ergaben ebenso keinen signifikanten Unterschied (Ohde et al., 2016b). Pietrelli et al. konnten nach lebenslangem Training von Ratten keinen Einfluss auf den Plasmaspiegel von Kortikosteron finden, während die Level von Hirnkortikosteron und CRH erhöht waren (Pietrelli et al., 2018). Im Gegensatz dazu zeigten Tiere des Garland-Mausmodells, welche auf hohe freiwillige körperliche Aktivität im Laufrad gezüchtet wurden, zweifach höhere Konzentrationen an zirkulierenden Kortikosteron als Kontrollmäuse (Singleton und Garland, 2019). Auch andere Tier-Studien konnten erhöhte Glukokortikoidspiegel infolge freiwilligen Trainings nachweisen (Shen et al., 2017, Ebada et al., 2016). In klinischen Studien mit menschlichen Athleten konnten hingegen, abhängig von Trainingszustand, Intensität und Dauer des Trainings, sowohl höhere als auch niedrigere Glukokortikoidspiegel gemessen werden (Anderson, 2019, Popovic et al., 2019, Sato et al., 2016), was entweder eine bessere Leistung infolge höherer Kortisolspiegel oder höhere Kortisolspiegel bei höherer Belastung suggeriert (siehe 1.2.3). Hill et al. beschrieben einen Blutzucker-abhängigen Effekt des Anstiegs der Konzentration der Glukokortikoide im Plasma, sobald der Blutzuckerspiegel während des Ausdauertrainings unter einen gewissen Schwellenwert absank (Hill et al., 2008). In Folgeexperimenten sollte neben der Bestimmung von CRH- und ACTH-Serumspiegeln auch unbedingt der Kortikosteronspiegel vor, nach und im Verlauf eines Ausdauerlaufbandtrainings in den DUHLB- und DUK-Mäusen untersucht werden, um zu ermitteln, ob und gegebenenfalls bei welcher Dauer und Intensität, das Training die Kortikosteronspiegel im Serum beeinflusst.

5.2.7 Gene, die funktionell zur Oxytozin-Achse zugeordnet werden können

Im Rahmen der Genexpressionsanalyse wurden auch die Expressionsunterschiede von OXT und Genen, die funktionell der OXT-Achse zugeordnet werden können, bestimmt (siehe 4.4.3), da auch OXT unter Trainings- und Stressbedingungen lipolytisch wirkt (siehe 1.2.3) und schon nach einem einmaligen Lauf erhöhte OXT-Spiegel im Speichel von Menschen gemessen werden konnten (Jong et al., 2015). Das OXT-Gen war auf RNA-Ebene jedoch weder in der Hypophyse von untrainierten DUHLB-Mäusen noch in der Hypophyse von trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen differentiell exprimiert. Um weitere Hinweise auf den OXT-Spiegel zu erhalten, wurde die Expression des Rezeptors OXTR auf RNA-Ebene in der Hypophyse der DUHLB- und DUK-Mäuse betrachtet. Das OXTR-Gen zeigte auch weder in untrainierten DUHLB-Mäusen noch in trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen einen Expressionsunterschied. Gutkowska et al. fanden eine erhöhte Expression von OXTR-mRNA und -Protein in Herzmuskelproben nach achtwöchigem Training (Gutkowska et al., 2009). Möglicherweise könnten OXTR-Level organspezifisch exprimiert werden, so dass es deswegen in der Hypophyse trainingsassoziiert zu keiner differentiellen Expression kam. Außerdem könnte die Trainingslänge von nur drei statt acht Wochen zu kurz gewesen sein, weswegen kein Expressionsunterschied messbar war. Die OXTR-Transkription wird außerdem durch Sexualsteroiden beeinflusst: In Nagern tritt eine erhöhte Expression von OXTR in Uterus und Gehirn nach Östrogenstimulation sowie im Uterus auch nach OXT-Stimulation auf (Richter et al., 2004, Breton und Zingg, 1997). Progesteron inhibiert die Expression von OXTR (Grazzini et al., 1998), während Testosteron eine höhere Affinität von OXT zu OXTR bewirkt (Tribollet et al., 1990). Resultierend aus den von Ohde et al. gemessenen Serumspiegeln der Sexualsteroiden in untrainierten DUHLB-Mäusen im Vergleich zu Kontrollen (Östrogen und Testosteron verringert, Progesteron erhöht (Ohde et al., 2016b)), würde dies eine Expressionsverminderung des OXTR-Gens implizieren. Die Expressionsverminderung konnte im vorliegenden Datensatz der Hypophyse nicht bestätigt werden und deutet somit auf einen geringen Einfluss der Steroide auf die OXTR-Expression in der Hypophyse hin.

Als vermeintlicher Regulator der Lipolyse durch OXT detektierten Deblon et al. den Transkriptionsfaktor PPAR α (Deblon et al., 2011). Dieser war in untrainierten DUHLB-Mäusen und nach freiwilliger körperlicher Aktivität im Vergleich zu DUK-Mäusen im Fettgewebe höher exprimiert (Brenmoehl et al., 2017). Da die erhöhte Expression von PPAR α im untrainierten Zustand nicht mit einer Lipolyse einhergeht, sondern diese erst nach körperlicher Aktivität auftritt, kann vermutet werden, dass ein möglicher über PPAR α -vermittelter OXT-Einfluss erst aktivitätsassoziiert von Bedeutung wird.

Außerdem wurde die Expression der Gene CD38 und TRPM2, die an der Signaltransduktion des OXTR beteiligt sind, untersucht (siehe 4.4.3). Beide Gene konnten weder in untrainierten DUHLB-Mäusen noch in trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen als differentiell exprimiert identifiziert werden. Park et al. fanden eine erhöhte CD38-Expression in Muskelproben von Mäusen bis zu sechs Stunden nach einem akuten Trainingslauf (Park et al., 2018). Möglicherweise sind Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse die unterschiedliche Trainingsart (ein akuter Trainingslauf vs. dreiwöchiges Ausdauertraining) oder ein zu langes Warten zwischen dem letzten Trainingslauf und der Probenentnahme bei DUHLB-Mäusen, so dass die sechs Stunden, die Park et al. aufführen, schon überschritten waren. Außerdem könnten auch hier die unterschiedlichen Gewebe

eine Rolle für die Expressionsunterschiede spielen. Zu trainingsassoziierten Genexpressionsunterschieden von CD38 und TRPM2 in der Hypophyse ist bisher nichts bekannt. Die vorliegenden Daten implizieren, dass die OXT-Achse weder in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung noch in Assoziation zu Training einer Hochregulation unterliegt. Die Ergebnisse sollten über die longitudinale Bestimmung der OXT-Serumspiegel in DUhLB- und DUK-Mäusen im Zusammenhang mit einem Ausdauerlaufbandtraining sowie im untrainierten Zustand und nach freiwilliger körperlicher Aktivität bestätigt werden.

5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Genexpressionsunterschiede, die in Assoziation mit hoher Ausdauerleistung bzw. einem dreiwöchigen Training stehen, auf RNA-Ebene in der Hypophyse von Mäusen quantifiziert werden. Dabei wurden Genexpressionsunterschiede im gesamten Transkriptom der Hypophyse im Zusammenhang mit einem Ausdauertraining untersucht.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse ließen eine linienspezifische differentielle Genexpression in der Hypophyse von DUhLB-Mäusen im Vergleich zu DUK-Mäusen erkennen. Das dreiwöchige Training führte auch zu Expressionsunterschieden im Transkriptom von DUhLB- und DUK-Mäusen. Gene, die sowohl in der Hypophyse untrainierter DUhLB-Mäuse als auch in trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen differentiell exprimiert waren, zeigten, dass die Langzeitselektion zu ähnlichen Genexpressionsunterschieden im Transkriptom führte wie das dreiwöchige Training. Die Expressionsunterschiede implizierten jedoch nicht die erwartete Hochregulation der unter körperlicher Aktivität lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen in Assoziation zum dreiwöchigen Training. Möglicherweise war die Intensität des Trainings nicht ausreichend, so dass sich keine Expressionsunterschiede auf Transkriptomebene in der Hypophyse manifestieren konnten. Des Weiteren könnten sich die Mäuse innerhalb des dreiwöchigen Trainings an die Laufanforderungen gewöhnt haben, so dass Expressionsunterschiede, die möglicherweise im Verlauf auftraten, nach drei Wochen nicht mehr quantifizierbar waren. Andererseits kann das Training mit drei Wochen auch zu kurz gewesen sein, um Expressionsunterschiede auf RNA-Ebene hervorzurufen. Außerdem deuteten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass eine hohe Ausdauerleistung nicht zur Hochregulation lipolytisch-wirkender Hypophysen-Achsen und damit einer gesteigerten Lipolyse im Fettgewebe führt. Die Selektion nach hoher Laufleistung reicht somit allein nicht aus, um Unterschiede in den Hypophysenachsen zwischen DUhLB- und DUK-Mäusen zu induzieren. Womöglich ist der Einfluss von Hypophysenhormonen auf die Fettmobilisation unter körperlicher Aktivität nicht so hoch wie bisher vermutet. Welche weiteren Faktoren damit im Zusammenspiel auf den Stoffwechsel wirken und letztendlich eine Fettmobilisation und bessere metabolische Gesundheit unter Ausdauersport bewirken, kann die vorliegende Arbeit nicht klären. Andere Hormone wie die Myokine und Adipokine könnten in diesem Zusammenhang eine größere Rolle spielen. Da die Analyse der Genexpressionsunterschiede im gesamten Transkriptom der Hypophyse einen neuen Untersuchungsaspekt darstellt, fällt es momentan noch schwer, die Ergebnisse mit aktueller Literatur zu vergleichen. Weitere Hypophysen-spezifische Daten aus anderen Studien sind daher notwendig, um letztendlich die Rolle der Hypophyse im Stoffwechsel unter körperlicher Aktivität weiter einzuordnen und daraus perspektivisch diagnostische und therapeutische Ziele für die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen abzuleiten.

In weiterführenden Experimenten sollten die Expressionsunterschiede im Transkriptom durch Analysen der Expression auf Proteinebene, bspw. über *western blot*, ergänzt werden. Zudem ist die Bestimmung von Serumwerten der jeweiligen Hypophysenhormone in Ruhe, nach einmaligem Lauf und nach dem Training anzuraten. Der Vorteil der Serumwertbestimmungen läge darin, dass auch Änderungen im Zeitverlauf durch regelmäßige Serumtests quantifizierbar wären. Hierfür könnten bspw. die Massenspektrometrie oder *enzyme-linked immunosorbent assay*-Tests genutzt werden. Interessant wäre es zudem, das Genom der Tiere zu betrachten, um so mögliche Unterschiede auf DNA-Ebene zu quantifizieren, die wiederum möglicherweise die Unterschiede auf Transkriptomebene erklären würden. Serumwerte in Kombination mit Genom-, Transkriptom- und Proteindaten der Hypophyse eröffnen potentiell die Möglichkeit, die Regulationen der Hypophysenachsen besser abzuschätzen.

Im Rahmen von weiteren Experimenten wäre es außerdem vielversprechend, Analysen zu einzelnen Zelltypen, bspw. mittels *single-cell transcriptomics* durchzuführen. Die bisher mittels RNAseq gewonnenen Daten lieferten nur Informationen für das gesamte Gewebe der Hypophyse. Insbesondere für die Hypophyse, die ein Organ, bestehend aus vielen verschiedenen Zelltypen, ist, wäre es anzuraten, Einzelzelldaten zu gewinnen, um zu beurteilen, welche Zellen bzw. Zelltypen die Genexpressionsunterschiede aufweisen. Zudem könnte überlegt werden, ob auch *small*-RNAseq durchgeführt werden soll, um zusätzliche Informationen zu microRNAs zu erhalten.

Es ist weiterhin empfehlenswert, bereits in anderen Studien beschriebene Expressionsunterschiede in den anderen am Stoffwechsel beteiligten Organen von DUHLB-Mäusen, wie Leber, Fettgewebe und Muskel, um weitere Expressionsanalysen auf Transkriptom- und Proteinebene zu ergänzen. Diese Analysen sollten sich auf Rezeptoren und die folgenden Signalwege der Hypophysenhormone in den jeweiligen Effektororganen beziehen. Die Bestimmung von interzellulären Botenstoffen, wie Adipokinen und Myokinen im Serum, ist ebenfalls zu erwägen. Dabei wäre es von Interesse, diese wiederum im Zusammenhang mit den Expressionsunterschieden in der Hypophyse zu betrachten. Mithilfe dieser sogenannten *crosstalk*-Studien besteht die Chance, die Interaktionen zwischen den am Stoffwechsel beteiligten Organen näher zu beleuchten.

6 Zusammenfassung

Sport stellt einen wichtigen präventiven Faktor bei der Entstehung von Stoffwechsel-, Herzkreislauf-, neurologischen, psychiatrischen und Krebserkrankungen dar. Während sportlicher Aktivität benötigt der Organismus aufgrund des gesteigerten Leistungsumsatzes mehr Energie in Form von Nährstoffen. Da der Stoffwechsel eines Organismus unter der Kontrolle zahlreicher Gewebe und Organe steht, die miteinander über Botenstoffe und Substrate kommunizieren, wird so eine Reaktion auf Einflüsse, wie bspw. sportliche Aktivität, ermöglicht und es können mehr Nährstoffe bereitgestellt werden. Dabei spielt die Hypophyse eine wichtige Rolle. Über die Sekretion von Hormonen, wie *growth hormone* (GH), Adrenokortikotropes Hormon (ACTH) oder Oxytozin (OXT), kann sie Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus unter körperlicher Aktivität nehmen. Die Hormone wirken dabei fettmobilisierend (lipolytisch) auf Effektoren wie Leber, Muskel oder Fettgewebe. Ob auch in der Hypophyse selbst Anpassungen infolge körperlicher Aktivität geschehen, ist bis dato noch nicht ausreichend erforscht. Eine Möglichkeit, Anpassungen auf einen äußeren Stimulus wie Sport zu untersuchen, besteht in der Analyse der Regulation der Genexpression. Die Genexpression auf RNA-Ebene kann über Methoden der Sequenzierung ermittelt werden. Durch Vergleiche mit Kontroll-Transkriptomen können die Expressionsunterschiede als Antwort auf innere oder äußere Stimuli, wie bspw. körperliche Aktivität, untersucht werden. Für solche Untersuchungen eignen sich Mausmodelle, die über die Selektion vieler Generationen von Mäusen nach bestimmten Merkmalen, generiert wurden. An ihnen können komplexe, genetische Anpassungsvorgänge nachvollzogen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsunterschiede betrachtet, die ein Laufbandtraining auf transkriptioneller Ebene in der Hypophyse von Mäusen bewirkt. Es wurde untersucht, ob eine Langzeitselektion nach hoher Laufleistung zu ähnlichen Expressionsunterschieden im Transkriptom führte wie ein dreiwöchiges Laufbandtraining bei nicht-selektierten Kontrollen.

Für die Untersuchung der Fragestellungen dieser Arbeit wurden Mäuse der auf hohe Laufleistung selektierten Dummerstorfer Mauslinie DUHLB gewählt. Die DUHLB-Mäuse sind in der Lage, für die Energiebereitstellung während körperlicher Aktivität effizient von der Akkumulation zur Mobilisation von Fett zu wechseln. Um die dafür verantwortlichen Mechanismen zu identifizieren, wurden DUHLB- und nicht-selektierte Mäuse einer Kontrolllinie (DUK-Linie) einem dreiwöchigen Trainingsexperiment auf einem Laufband unterzogen. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle Tiere beider Linien nicht trainiert. Von Mäusen aus diesen vier Gruppen (acht Mäuse pro Gruppe, n=32) wurden Proben der Hypophyse entnommen und für eine Analyse mittels RNA-Sequenzierung (RNAseq) verwendet. Die RNAseq-Expressionsdaten wurden mittels quantitativer Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) technisch validiert. Eine Analyse mittels der Software Ingenuity Pathway Analysis® diente dazu, die transkriptionellen Expressionsunterschiede in Geninteraktionsnetzwerken zu visualisieren und funktionell zu interpretieren. Es wurde dabei auch nach Genen gesucht, die funktionell zu den drei Hypophysenachsen GH, ACTH und OXT zugeordnet werden können. Der Fokus der funktionellen Analysen lag auf dem Vergleich der Transkriptome von DUHLB-Mäusen und DUK-Mäusen ohne Training (DUHLB vs DUK_oB) sowie auf dem Vergleich zwischen DUK-Mäusen mit und ohne Training (DUK_LB vs oB). Auf diese Weise wurden die Gene herausgefiltert, die in Assoziation zu hoher Ausdauerlaufleistung (DUHLB vs DUK_oB) oder Training (DUK_LB vs oB) differentiell exprimiert

worden sind. Als signifikante Genexpressionsunterschiede galten solche mit einer *false discovery rate* (FDR) <0,05.

Mittels RNAseq konnte die Expression von 17.429 verschiedenen Genen in der Hypophyse gemessen werden. In Assoziation zu hoher Ausdauerleistung waren fast dreimal so viele differentiell exprimierte Gentranskripte (DEGs) quantifizierbar wie in Assoziation zum Training (1732 bzw. 637). Um herauszufinden, welche DEGs sowohl im Zusammenhang mit hoher Ausdauerleistung als auch mit Training differentiell exprimiert waren, wurde die Schnittmenge der beiden Genlisten untersucht. Es wurden 120 DEGs quantifiziert, die sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen differentiell exprimiert waren. Davon konnten elf DEGs funktionell den *solute carrier* (SLC)-Transportern zugeordnet werden. Bis auf wenige Ausnahmen waren diese SLC-Transporter-Gene in untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen vermindert exprimiert. Eine Ausnahme bildete die Expressionserhöhung des Transkripts SLC2A3, welches den Glukosetransporter GLUT3 kodiert, in untrainierten DUhLB-Mäusen im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen. Außerdem konnten nicht-differentiell exprimierte Ketonkörper- und Fettsäuretransporter sowie weitere Gene, wie bspw. *cluster of differentiation* (CD36) und Fettsäurebindungsprotein (FABP4, beide vermindert exprimiert), die auf einen verminderten Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse hindeuten, in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung identifiziert werden. In Kombination mit der differentiellen Expression von SLC2A3 wies dies auf einen erhöhten Glukosebedarf der Hypophyse in DUhLB-Mäusen hin. Die verminderte Expression von Transportern der SLC6-Familie, die für die Gammaaminobuttersäure (GABA)-Wiederaufnahme in die Präsynapse zuständig ist, ließ auf eine verstärkte Signalübertragung an GABAergen Synapsen in der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen und trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen schließen. Höhere RNA-Level von GABA-Rezeptoren in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung und Training untermauerten diesen Schluss. Zudem war eine Expressionsverminderung von Wachstumsfaktoren sowohl in untrainierten DUhLB-Mäusen als auch in trainierten DUK-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen zu erkennen. Die differentielle Expression von *insulin-like growth factor 2* (IGF2), Sphingosinkinase 1 (SPHK1, beide in DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB), *early growth response* (EGR) 1 und 2 (beide nur in DUhLB vs DUK_oB) deutete dabei auf ein vermindertes Zellwachstum hin, während die verminderte Expression von *secreted frizzled-related protein 1* (SFRP1, in DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB) eher für gesteigertes Zellwachstum sprach. Eine Expressionsverminderung des Östrogenrezeptors ESR1 in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung ließ sich nicht mit bereits in Vorexperimenten gemessenen verminderten Östrogen-Serumspiegeln in DUhLB-Mäusen vereinbaren. Die verminderte Expression von ESR1 ließ, wie auch die der Faktoren IGF2, EGR2, Leptinrezeptor (LEPR) und Hypophysen-spezifischer positiver Transkriptionsfaktor 1 (POU1F1), keine Hochregulation der GH-Achse in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung und Training vermuten. Die Analyse der Expression von Genen, die mit der GH-Achse assoziiert werden können (*growth hormone releasing hormone* Rezeptor (GHRHR, weder in DUhLB vs DUK_oB noch in DUK_LB vs oB differentiell exprimiert), Ghrelinrezeptor (GHSR) und Somatostatinrezeptor 2 (SSTR2, beide in DUhLB vs DUK_oB vermindert exprimiert)), festigte diese Vermutung. Dem entgegen sprach die mutmaßlich erhöhte Signalübertragung an GABAergen Synapsen, da diese mit einer GH-Hochregulation in Zusammenhang gebracht werden könnte. Gene, die mit der ACTH- und OXT-Achse assoziiert werden können, zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede und ermöglichten daher keine Aussage zur Regulation der ACTH- und OXT-Achsen.

Die vorliegenden Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die Expressionsunterschiede auf RNA-Ebene in der Hypophyse der DUhLB-Mäuse linienspezifische Anpassungen an hohe Ausdauerleistung zeigen könnten. Die Hypothese, dass die Expressionsunterschiede im Transkriptom der Hypophyse von DUhLB-Mäusen durch die Langezeitselektion zu ähnlichen Genexpressionsunterschieden führen wie ein dreiwöchiges Laufbandtraining, kann nur für einen kleinen Teil der DEGs angenommen werden (7% von 1732 DEGs). Die Ergebnisse implizierten nicht die vermutete Hochregulation der unter körperlicher Aktivität lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen in Assoziation zu Training oder hoher Ausdauerleistung. Es ist für weitere, zukünftige Studien empfehlenswert, Serumanalysen der Hormone GH, ACTH und OXT zur Untersuchung der Konzentration der Hormone im Blut der hier untersuchten Mäuse durchzuführen. Dies könnte im Zusammenspiel mit den bereits bestimmten Transkriptomdaten weitere Aufschlüsse über die Regulation der Hypophysenachsen bringen.

7 Literaturverzeichnis

- ABOSHADY, H. M., MANDONNET, N., STEAR, M. J., ARQUET, R., BEDERINA, M., SARRY, J., TOSSER-KLOPP, G., KLOPP, C., JOHANSSON, A. M., JONAS, E., et al. 2019. Transcriptome variation in response to gastrointestinal nematode infection in goats. *PLoS One*, 14, e0218719.
- ADAMS, M. D., KELLEY, J. M., GOCAYNE, J. D., DUBNICK, M., POLYMERPOULOS, M. H., XIAO, H., MERRIL, C. R., WU, A., OLDE, B., MORENO, R. F., et al. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252, 1651-6.
- ALLENSWORTH-JAMES, M. L., ODLE, A., HANEY, A., MACNICOL, M., MACNICOL, A. & CHILDS, G. 2018. Sex-specific changes in postnatal GH and PRL secretion in somatotrope LEPR-null mice. *J Endocrinol*, 238, 221-30.
- ALSHAFIE, W., FRANCIS, V., BEDNARZ, K., PAN, Y. E., STROH, T. & MCPHERSON, P. S. 2020. Regulated resurfacing of a somatostatin receptor storage compartment fine-tunes pituitary secretion. *J Cell Biol*, 219, e201904054.
- ALTIRRIBA, J., POHER, A. L., CAILLON, A., ARSENIJEVIC, D., VEYRAT-DUREBEX, C., LYAUTEY, J., DULLOO, A. & ROHNER-JEANRENAUD, F. 2014. Divergent effects of oxytocin treatment of obese diabetic mice on adiposity and diabetes. *Endocrinology*, 155, 4189-201.
- AN, Y., VARMA, V. R., VARMA, S., CASANOVA, R., DAMMER, E., PLETNIKOVA, O., CHIA, C. W., EGAN, J. M., FERRUCCI, L., TRONCOSO, J., et al. 2018. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 14, 318-29.
- ANDERS, S., PYL, P. T. & HUBER, W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-9.
- ANDERSON, L. L., JEFTINIJA, S. & SCANES, C. G. 2004. Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229, 291-302.
- ANDERSON, L. L. & SCANES, C. G. 2012. Nanobiology and physiology of growth hormone secretion. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237, 126-42.
- ANDERSON, R. A. & MITCHELL, R. 1986. Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists on the secretion of growth hormone, luteinizing hormone, adrenocorticotrophic hormone and thyroid-stimulating hormone from the rat pituitary gland in vitro. *J Endocrinol*, 108, 1-8.
- ANDERSON, T. B., N. T.; WIDEMAN, L. 2019. Exercise and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: a special focus on acute cortisol and growth hormone responses. *Curr Opin Endocr Metab Res*, 9, 74-7.
- AUMÜLLER, G. 2017. Duale Reihe Anatomie. *Georg-Thieme-Verlag*, 4. Auflage.
- AVTANSKI, D., NOVAIRA, H. J., WU, S., ROMERO, C. J., KINEMAN, R., LUQUE, R. M., WONDISFORD, F. & RADOVICK, S. 2014. Both estrogen receptor alpha and beta stimulate pituitary GH gene expression. *Mol Endocrinol*, 28, 40-52.
- AYOGLU, B., MITSIOS, N., KOCKUM, I., KHADEMI, M., ZANDIAN, A., SJÖBERG, R., FORSTRÖM, B., BREDENBERG, J., LIMA BOMFIM, I., HOLMGREN, E., et al. 2016. Anoctamin 2 identified as an autoimmune target in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 2188-93.
- BAHARUDIN, R., TIENG, F. Y. F., LEE, L. H. & AB MUTALIB, N. S. 2020. Epigenetics of SFRP1: The Dual Roles in Human Cancers. *Cancers (Basel)*, 12, 445.
- BALLESTER, M., CORDON, R. & FOLCH, J. M. 2013. DAG expression: high-throughput gene expression analysis of real-time PCR data using standard curves for relative quantification. *PLoS One*, 8, e80385.
- BARKHOUDARIAN, G. & KELLY, D. F. 2017. The Pituitary Gland: Anatomy, Physiology, and its Function as the Master Gland. *Academic Press Inc*, Editors: Edward A. Laws Jr. & Louise Pace.
- BARRETT, R., NARASIMHULU, C. A. & PARTHASARATHY, S. 2018. Adrenergic hormones induce extrapituitary prolactin gene expression in leukocytes-potential implications in obesity. *Sci Rep*, 8, 1936.

- BEAUVILLE, M., HARANT, I., CRAMPES, F., RIVIERE, D., TAUBER, M. T., TAUBER, J. P. & GARRIGUES, M. 1992. Effect of long-term rhGH administration in GH-deficient adults on fat cell epinephrine response. *Am J Physiol*, 263, E467-72.
- BECIC, T., STUDENIK, C. & HOFFMANN, G. 2018. Exercise Increases Adiponectin and Reduces Leptin Levels in Prediabetic and Diabetic Individuals: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Med Sci (Basel)*, 6, 97.
- BEGEMANN, M., ZIRN, B., SANTEN, G., WIRTHGEN, E., SOELLNER, L., BUTTEL, H. M., SCHWEIZER, R., VAN WORKUM, W., BINDER, G. & EGGERMANN, T. 2015. Paternally Inherited IGF2 Mutation and Growth Restriction. *N Engl J Med*, 373, 349-56.
- BEN-SHLOMO, A. & MELMED, S. 2010. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 21, 123-33.
- BENJAMINI, Y. & HOCHBERG, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 57, 289-300.
- BERGAN-ROLLER, H. E. & SHERIDAN, M. A. 2018. The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen Comp Endocrinol*, 258, 119-33.
- BERGMAN, D., HALJE, M., NORDIN, M. & ENGSTRÖM, W. 2013. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology*, 59, 240-9.
- BERRYMAN, D. E., LIST, E. O., PALMER, A. J., CHUNG, M. Y., WRIGHT-PIEKARSKI, J., LUBBERS, E., O'CONNOR, P., OKADA, S. & KOPCHICK, J. J. 2010. Two-year body composition analyses of long-lived GHR null mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65, 31-40.
- BETHIN, K. E., VOGT, S. K. & MUGLIA, L. J. 2000. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9317-22.
- BIRLA, S., VIJAYAKUMAR, P., SEHGAL, S., BHATNAGAR, S., PALLAVI, K. & SHARMA, A. 2019. Characterization of a Novel POU1F1 Mutation Identified on Screening 160 Growth Hormone Deficiency Patients. *Horm Metab Res*, 51, 248-55.
- BLAND, J. M. & ALTMAN, D. G. 1995. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *Bmj*, 310, 170.
- BOSTRÖM, P., WU, J., JEDRYCHOWSKI, M. P., KORDE, A., YE, L., LO, J. C., RASBACH, K. A., BOSTRÖM, E. A., CHOI, J. H., LONG, J. Z., et al. 2012. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481, 463-8.
- BOUCHARD, C., RANKINEN, T. & TIMMONS, J. A. 2011. Genomics and genetics in the biology of adaptation to exercise. *Compr Physiol*, 1, 1603-48.
- BOUCHOUCHA, Y. X., CHARNAY, P. & GILARDI-HEBENSTREIT, P. 2013. Ablation of Egr2-positive cells in male mouse anterior pituitary leads to atypical isolated GH deficiency. *Endocrinology*, 154, 270-82.
- BRENMOEHL, J., ALBRECHT, E., KOMOLKA, K., SCHERING, L., LANGHAMMER, M., HOEFLICH, A. & MAAK, S. 2014. Irisin is elevated in skeletal muscle and serum of mice immediately after acute exercise. *Int J Biol Sci*, 10, 338-49.
- BRENMOEHL, J. & HOEFLICH, A. 2013. Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *Mitochondrion*, 13, 755-61.
- BRENMOEHL, J., OHDE, D., ALBRECHT, E., WALZ, C., TUCHSCHERER, A. & HOEFLICH, A. 2017. Browning of subcutaneous fat and higher surface temperature in response to phenotype selection for advanced endurance exercise performance in male DUhTP mice. *J Comp Physiol B*, 187, 361-73.
- BRENMOEHL, J., OHDE, D., WALZ, C., LANGHAMMER, M., SCHULTZ, J. & HOEFLICH, A. 2020. Analysis of Activity-Dependent Energy Metabolism in Mice Reveals Regulation of Mitochondrial Fission and Fusion mRNA by Voluntary Physical Exercise in Subcutaneous Fat from Male Marathon Mice (DUhTP). *Cells*, 9, 2697.

- BRENMOEHL, J., OHDE, D., WALZ, C., SCHULTZ, J., TUCHSCHERER, A., RIEDER, F., RENNE, U. & HOEFLICH, A. 2015. Dynamics of Fat Mass in DUhTP Mice Selected for Running Performance - Fat Mobilization in a Walk. *Obes Facts*, 8, 373-85.
- BRENMOEHL, J., WALZ, C., RENNE, U., PONSUKSILI, S., WOLF, C., LANGHAMMER, M., SCHWERIN, M. & HOEFLICH, A. 2013. Metabolic adaptations in the liver of born long-distance running mice. *Med Sci Sports Exerc*, 45, 841-50.
- BRENT, G. A. 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 122, 3035-43.
- BRETON, C. & ZINGG, H. H. 1997. Expression and region-specific regulation of the oxytocin receptor gene in rat brain. *Endocrinology*, 138, 1857-62.
- BROOKS, G. A. & MERCIER, J. 1994. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J Appl Physiol* (1985), 76, 2253-61.
- BRYAN, L., KORDULA, T., SPIEGEL, S. & MILSTIEN, S. 2008. Regulation and functions of sphingosine kinases in the brain. *Biochim Biophys Acta*, 1781, 459-66.
- BRYZGALOVA, G., GAO, H., AHREN, B., ZIERATH, J. R., GALUSKA, D., STEILER, T. L., DAHLMAN-WRIGHT, K., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J. A., EFENDIC, S., et al. 2006. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia*, 49, 588-97.
- BURGER, L. L., HAISENLEDER, D. J., AYLOR, K. W. & MARSHALL, J. C. 2009. Regulation of Lhb and Egr1 gene expression by GNRH pulses in rat pituitaries is both c-Jun N-terminal kinase (JNK)- and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent. *Biol Reprod*, 81, 1206-15.
- CABIA, B., ANDRADE, S., CARREIRA, M. C., CASANUEVA, F. F. & CRUJEIRAS, A. B. 2016. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. *Obes Rev*, 17, 361-76.
- CADEGIANI, F. A. & KATER, C. E. 2019. Enhancement of hypothalamic-pituitary activity in male athletes: evidence of a novel hormonal mechanism of physical conditioning. *BMC Endocr Disord*, 19, 117.
- CADNEY, M. D., HIRAMATSU, L., THOMPSON, Z., ZHAO, M., KAY, J. C., SINGLETON, J. M., ALBUQUERQUE, R. L., SCHMILL, M. P., SALTZMAN, W. & GARLAND, T., JR. 2021. Effects of early-life exposure to Western diet and voluntary exercise on adult activity levels, exercise physiology, and associated traits in selectively bred High Runner mice. *Physiol Behav*, 234, 113389.
- CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84, 277-359.
- CARMEAN, C. M., COHEN, R. N. & BRADY, M. J. 2014. Systemic regulation of adipose metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 424-30.
- CASSARINO, M. F., SESTA, A., PAGLIARDINI, L., LOSA, M., LASIO, G., CAVAGNINI, F. & PECORI GIRALDI, F. 2017. Proopiomelanocortin, glucocorticoid, and CRH receptor expression in human ACTH-secreting pituitary adenomas. *Endocrine*, 55, 853-60.
- CASTRO, A. A. & GARLAND, T., JR. 2018. Evolution of hindlimb bone dimensions and muscle masses in house mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. *J Morphol*, 279, 766-79.
- CAVAGNINI, F., INVITTI, C., PINTO, M., MARASCHINI, C., DI LANDRO, A., DUBINI, A. & MARELLI, A. 1980. Effect of acute and repeated administration of gamma aminobutyric acid (GABA) on growth hormone and prolactin secretion in man. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 93, 149-54.
- CHAVES, V. E., FRASSON, D. & KAWASHITA, N. H. 2011. Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie*, 93, 1631-40.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.
- CHRISTOFIDES, A., KONSTANTINIDOU, E., JANI, C. & BOUSSIOTIS, V. A. 2021. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism*, 114, 154338.
- CLAGHORN, G. C., THOMPSON, Z., WI, K., VAN, L. & GARLAND, T., JR. 2017. Caffeine stimulates voluntary wheel running in mice without increasing aerobic capacity. *Physiol Behav*, 170, 133-40.

- COTTRELL, E. C. & MERCER, J. G. 2012. Leptin receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 209, 3-21.
- DAKIN, R. S., WALKER, B. R., SECKL, J. R., HADOKE, P. W. & DRAKE, A. J. 2015. Estrogens protect male mice from obesity complications and influence glucocorticoid metabolism. *Int J Obes (Lond)*, 39, 1539-47.
- DALLMAN, M. F., AKANA, S. F., CASCIO, C. S., DARLINGTON, D. N., JACOBSON, L. & LEVIN, N. 1987. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res*, 43, 113-73.
- DARLINGTON, T. M., MCCARTHY, R. D., COX, R. J., MIYAMOTO-DITMON, J., GALLEGGO, X. & EHRINGER, M. A. 2016. Voluntary wheel running reduces voluntary consumption of ethanol in mice: identification of candidate genes through striatal gene expression profiling. *Genes Brain Behav*, 15, 474-90.
- DAVIES, J., DENYER, T. & HADFIELD, J. 2016. Bioanalyzer chips can be used interchangeably for many analyses of DNA or RNA. *Biotechniques*, 60, 197-9.
- DEBLON, N., VEYRAT-DUREBEX, C., BOURGOIN, L., CAILLON, A., BUSSIER, A. L., PETROSINO, S., PISCITELLI, F., LEGROS, J. J., GEENEN, V., FOTI, M., et al. 2011. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. *PLoS One*, 6, e25565.
- DIETL, G., LANGHAMMER, M. & RENNE, U. 2004. Model simulations for genetic random drift in the outbred strain Fzt:DU. *Arch Tierz*, 6, 595-604.
- DING, C., LEOW, M. K. & MAGKOS, F. 2019. Oxytocin in metabolic homeostasis: implications for obesity and diabetes management. *Obes Rev*, 20, 22-40.
- DORNBOS, D., 3RD, ZWAGERMAN, N., GUO, M., DING, J. Y., PENG, C., ESMAIL, F., SIKHARAM, C., GENG, X., GUTHIKONDA, M. & DING, Y. 2013. Preischemic exercise reduces brain damage by ameliorating metabolic disorder in ischemia/reperfusion injury. *J Neurosci Res*, 91, 818-27.
- DORVAL, V., MANDEMAKERS, W., JOLIVETTE, F., COUDERT, L., MAZROUI, R., DE STROOPER, B. & HEBERT, S. S. 2014. Gene and MicroRNA transcriptome analysis of Parkinson's related LRRK2 mouse models. *PLoS One*, 9, e85510.
- DURAN-ORTIZ, S., NOBOA, V. & KOPCHICK, J. J. 2018. Disruption of the GH receptor gene in adult mice and in insulin sensitive tissues. *Growth Horm IGF Res*, 38, 3-7.
- EBADA, M. E., KENDALL, D. A. & PARDON, M. C. 2016. Corticosterone and dopamine D2/D3 receptors mediate the motivation for voluntary wheel running in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*, 311, 228-38.
- ECKERTOVA, M., ONDREJCAKOVA, M., KRSKOVA, K., ZORAD, S. & JEZOVA, D. 2011. Subchronic treatment of rats with oxytocin results in improved adipocyte differentiation and increased gene expression of factors involved in adipogenesis. *Br J Pharmacol*, 162, 452-63.
- ERLICH, H. A. 1989. Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol*, 9, 437-47.
- FALKENBERG, H., LANGHAMMER, M. & RENNE, U. 2000. Comparison of biochemical blood traits after long-term selection on high or low locomotory activity in mice. *Arch Tierz*, 5, 513-22.
- FAN, Y., MENON, R. K., COHEN, P., HWANG, D., CLEMENS, T., DIGIROLAMO, D. J., KOPCHICK, J. J., LE ROITH, D., TRUCCO, M. & SPERLING, M. A. 2009. Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem*, 284, 19937-44.
- FIUZA-LUCES, C., SANTOS-LOZANO, A., JOYNER, M., CARRERA-BASTOS, P., PICAZO, O., ZUGAZA, J. L., IZQUIERDO, M., RUILOPE, L. M. & LUCIA, A. 2018. Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. *Nat Rev Cardiol*, 15, 731-43.
- FRAYN, K. N. 2010. Fat as a fuel: emerging understanding of the adipose tissue-skeletal muscle axis. *Acta Physiol (Oxf)*, 199, 509-18.
- FU, B., YU, X., TONG, J., PANG, M., ZHOU, Y., LIU, Q. & TAO, W. 2019. Comparative transcriptomic analysis of hypothalamus-pituitary-liver axis in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) with differential growth rate. *BMC Genomics*, 20, 328.
- FURUHASHI, M. 2019. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb*, 26, 216-32.

- GARIN-SHKOLNIK, T., RUDICH, A., HOTAMISLIGIL, G. S. & RUBINSTEIN, M. 2014. FABP4 attenuates PPARgamma and adipogenesis and is inversely correlated with PPARgamma in adipose tissues. *Diabetes*, 63, 900-11.
- GLASEL, J. A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18, 62-3.
- GONZALEZ, A. A., SALINAS-PARRA, N., CIFUENTES-ARANEDA, F. & REYES-MARTINEZ, C. 2020. Vasopressin actions in the kidney renin angiotensin system and its role in hypertension and renal disease. *Vitam Horm*, 113, 217-38.
- GRAZZINI, E., GUILLON, G., MOUILLAC, B. & ZINGG, H. H. 1998. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, 392, 509-12.
- GREENWOOD, M., PATERSON, A., RAHMAN, P. A., GILLARD, B. T., LANGLEY, S., IWASAKI, Y., MURPHY, D. & GREENWOOD, M. P. 2020. Transcription factor Creb3l1 regulates the synthesis of prohormone convertase enzyme PC1/3 in endocrine cells. *J Neuroendocrinol*, 32, e12851.
- GRIFFITH, M., WALKER, J. R., SPIES, N. C., AINSCOUGH, B. J. & GRIFFITH, O. L. 2015. Informatics for RNA Sequencing: A Web Resource for Analysis on the Cloud. *PLoS Comput Biol*, 11, e1004393.
- GUTKOWSKA, J., BRODERICK, T. L., BOGDAN, D., WANG, D., LAVOIE, J. M. & JANKOWSKI, M. 2009. Downregulation of oxytocin and natriuretic peptides in diabetes: possible implications in cardiomyopathy. *J Physiol*, 587, 4725-36.
- HAKIMI, M. & ALI-MOHAMMADI, M. 2019. The Effect of Concurrent Exercise Order (Resistance and Endurance) on Lipid Profile, Leptin Serum and Insulin Resistance Index in Overweight Women. *Int J Sports Exerc Med*, 5, 1-8.
- HALABCHI, F., ALIZADEH, Z., SAHRAIAN, M. A. & ABOLHASANI, M. 2017. Exercise prescription for patients with multiple sclerosis; potential benefits and practical recommendations. *BMC Neurol*, 17, 185.
- HAN, J., SHAO, J., CHEN, Q., SUN, H., GUAN, L., LI, Y., LIU, J. & LIU, H. 2019. Transcriptional changes in the hypothalamus, pituitary, and mammary gland underlying decreased lactation performance in mice under heat stress. *FASEB J*, 33, 12588-601.
- HAN, T.-K. & SO, W.-Y. 2016. Effect of ten weeks of combined exercise on growth hormone, insulin-like growth factor-2 and myostatin levels in elderly Korean women. *South African Journal for Research in Sport, Physical Education and Recreation*, 38, 61-7.
- HARDIN, J., BERTONI, G. & KLEINSMITH, L. 2015. Beckers Welt der Zelle. *Pearson Deutschland GmbH*
- HARNO, E., GALI RAMAMOORTHY, T., COLL, A. P. & WHITE, A. 2018. POMC: The Physiological Power of Hormone Processing. *Physiol Rev*, 98, 2381-430.
- HAUSSWIRTH, C. & LE MEUR, Y. 2011. Physiological and nutritional aspects of post-exercise recovery: specific recommendations for female athletes. *Sports Med*, 41, 861-82.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- HERBET, M., NATORSKA-CHOMICKA, D., KORGA, A., OSTROWSKA, M., IZDEBSKA, M., GAWROŃSKA-GRZYWACZ, M., PIĄTKOWSKA-CHMIEL, I., PAWŁOWSKI, K., ŚLASKA, B., POLESZAK, E., et al. 2019. Altered expression of genes involved in brain energy metabolism as adaptive responses in rats exposed to chronic variable stress; changes in cortical level of glucogenic and neuroactive amino acids. *Mol Med Rep*, 19, 2386-96.
- HESS, P. L., AL-KHALIDI, H. R., FRIEDMAN, D. J., MULDER, H., KUCHARSKA-NEWTON, A., ROSAMOND, W. R., LOPES, R. D., GERSH, B. J., MARK, D. B., CURTIS, L. H., et al. 2017. The Metabolic Syndrome and Risk of Sudden Cardiac Death: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Am Heart Assoc*, 6, e006103.
- HIGASHIDA, H., YUHI, T., AKTHER, S., AMINA, S., ZHONG, J., LIANG, M., NISHIMURA, T., LIU, H. X. & LOPATINA, O. 2018. Oxytocin release via activation of TRPM2 and CD38 in the hypothalamus during hyperthermia in mice: Implication for autism spectrum disorder. *Neurochem Int*, 119, 42-8.

- HILL, E. E., ZACK, E., BATTAGLINI, C., VIRU, M., VIRU, A. & HACKNEY, A. C. 2008. Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. *J Endocrinol Invest*, 31, 587-91.
- HILLIS, D. A., YADGARY, L., WEINSTOCK, G. M., PARDO-MANUEL DE VILLENA, F., POMP, D., FOWLER, A. S., XU, S., CHAN, F. & GARLAND, T., JR. 2020. Genetic Basis of Aerobically Supported Voluntary Exercise: Results from a Selection Experiment with House Mice. *Genetics*, 216, 781-804.
- HIRAMATSU, L. & GARLAND, T., JR. 2018. Mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior conserve more fat despite increased exercise. *Physiol Behav*, 194, 1-8.
- HOEFELICH, A., FITZNER, B., WALZ, C., HECKER, M., TUCHSCHERER, A., BRENMÖHL, J. & ZETTL, U. K. 2020. Reduced Fragmentation of IGFBP-2 and IGFBP-3 as a Potential Mechanism for Decreased Ratio of IGF-II to IGFBPs in Cerebrospinal Fluid in Response to Repeated Intrathecal Administration of Triamcinolone Acetonide in Patients With Multiple Sclerosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 565557.
- HORODYSKA, J., WIMMERS, K., REYER, H., TRAKOOLJUL, N., MULLEN, A. M., LAWLOR, P. G. & HAMILL, R. M. 2018. RNA-seq of muscle from pigs divergent in feed efficiency and product quality identifies differences in immune response, growth, and macronutrient and connective tissue metabolism. *BMC Genomics*, 19, 791.
- HOROWITZ, J. F. & KLEIN, S. 2000. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr*, 72, 558s-63s.
- HOWLES, C. M. 2000. Role of LH and FSH in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*, 161, 25-30.
- HU, C., TAO, L. & CAO, X. 2019. The solute carrier transporters and the brain: physiological and pharmacological implications. *Asian J Pharm Sci*, 15, 131-44.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION 2006. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *Abrufbar über: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html> (besucht am 01.04.2021)*.
- ISO, T., HARUYAMA, H., SUNAGA, H., MATSUI, M., MATSUI, H., TANAKA, R., UMBARAWAN, Y., SYAMSUNARNO, M., YOKOYAMA, T. & KURABAYASHI, M. 2019. Exercise endurance capacity is markedly reduced due to impaired energy homeostasis during prolonged fasting in FABP4/5 deficient mice. *BMC Physiol*, 19, 1.
- ISO, T., SUNAGA, H., MATSUI, H., KASAMA, S., OSHIMA, N., HARUYAMA, H., FURUKAWA, N., NAKAJIMA, K., MACHIDA, T., MURAKAMI, M., et al. 2017. Serum levels of fatty acid binding protein 4 and fat metabolic markers in relation to catecholamines following exercise. *Clin Biochem*, 50, 896-902.
- IVY, J. L. 2004. Regulation of muscle glycogen repletion, muscle protein synthesis and repair following exercise. *J Sports Sci Med*, 3, 131-8.
- JAHANGIRI, M., SHAHHOSEINI, M. & MOVAGHAR, B. 2018. The Effect of Vitrification on Expression and Histone Marks of Igf2 and Oct4 in Blastocysts Cultured from Two-Cell Mouse Embryos. *Cell J*, 19, 607-13.
- JANKOWSKI, M., BRODERICK, T. L. & GUTKOWSKA, J. 2016. Oxytocin and cardioprotection in diabetes and obesity. *BMC Endocr Disord*, 16, 34.
- JEPPESEN, J. & KIENS, B. 2012. Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *J Physiol*, 590, 1059-68.
- JONG, T. R., MENON, R., BLUDAU, A., GRUND, T., BIERMEIER, V., KLAMPFL, S. M., JUREK, B., BOSCH, O. J., HELLHAMMER, J. & NEUMANN, I. D. 2015. Salivary oxytocin concentrations in response to running, sexual self-stimulation, breastfeeding and the TSST: The Regensburg Oxytocin Challenge (ROC) study. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 381-8.
- JUGE, N., MUROYAMA, A., HIASA, M., OMOTE, H. & MORIYAMA, Y. 2009. Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J Biol Chem*, 284, 35073-8.
- KARATSOREOS, I. N., BHAGAT, S. M., BOWLES, N. P., WEIL, Z. M., PFAFF, D. W. & MCEWEN, B. S. 2010. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology*, 151, 2117-27.

- KAY, J. C., RAMIREZ, J., CONTRERAS, E. & GARLAND, T., JR. 2018. Reduced non-bicarbonate skeletal muscle buffering capacity in mice with the mini-muscle phenotype. *J Exp Biol*, 221, jeb172478.
- KELLER-WOOD, M. 2015. Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control. *Compr Physiol*, 5, 1161-82.
- KELLY, S. A., GOMES, F. R., KOLB, E. M., MALISCH, J. L. & GARLAND, T., JR. 2017. Effects of activity, genetic selection and their interaction on muscle metabolic capacities and organ masses in mice. *J Exp Biol*, 220, 1038-47.
- KHAIRALLAH, H., EL ANDALOUSI, J., SIMARD, A., HADDAD, N., CHEN, Y. H., HOU, J., RYAN, A. K. & GUPTA, I. R. 2014. Claudin-7, -16, and -19 during mouse kidney development. *Tissue Barriers*, 2, e964547.
- KIENS, B., ROEPSTORFF, C., GLATZ, J. F., BONEN, A., SCHJERLING, P., KNUDSEN, J. & NIELSEN, J. N. 2004. Lipid-binding proteins and lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle: influence of physical activity and gender. *J Appl Physiol (1985)*, 97, 1209-18.
- KIM, J. & LIM, K. 2016. Relationship between FAT/CD36 Protein in Skeletal Muscle and Whole-body Fat Oxidation in Endurance-trained Mice. *J Exerc Nutrition Biochem*, 20, 48-52.
- KIM, S. H., NOH, M. Y., KIM, H. J., OH, K. W., PARK, J., LEE, S., MOON, Y., KIM, Y. E., BAE, J. S. & JIN, H. K. 2019. A Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease Focused on Immune-inflammatory Modulation. *Dement Neurocogn Disord*, 18, 33-46.
- KIM, T. H., CHANG, J. S., PARK, K. S., PARK, J., KIM, N., LEE, J. I. & KONG, I. D. 2017. Effects of exercise training on circulating levels of Dickkopf-1 and secreted frizzled-related protein-1 in breast cancer survivors: A pilot single-blind randomized controlled trial. *PLoS One*, 12, e0171771.
- KIRK, S. E., XIE, T. Y., STEYN, F. J., GRATTAN, D. R. & BUNN, S. J. 2017. Restraint stress increases prolactin-mediated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 in the hypothalamus and adrenal cortex in the male mouse. *J Neuroendocrinol*, 29, 1-9.
- KLIEVERIK, L. P., COOMANS, C. P., ENDERT, E., SAUERWEIN, H. P., HAVEKES, L. M., VOSHOL, P. J., RENSEN, P. C., ROMIJN, J. A., KALSBECK, A. & FLIERS, E. 2009. Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology*, 150, 5639-48.
- KRÄMER, A., GREEN, J., POLLARD, J., JR. & TUGENDREICH, S. 2014. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, 30, 523-30.
- KUNDT, G., KRENTZ, H. & GLASS, Ä. 2016. Epidemiologie und Medizinische Biometrie. *Shaker Verlag*, 11. überarbeitete Auflage.
- LAGATHU, C., CHRISTODOULIDES, C., TAN, C. Y., VIRTUE, S., LAUDES, M., CAMPBELL, M., ISHIKAWA, K., ORTEGA, F., TINAHONES, F. J., FERNÁNDEZ-REAL, J. M., et al. 2010. Secreted frizzled-related protein 1 regulates adipose tissue expansion and is dysregulated in severe obesity. *Int J Obes (Lond)*, 34, 1695-705.
- LAWSON, E. A., OLSZEWSKI, P. K., WELLER, A. & BLEVINS, J. E. 2020. The role of oxytocin in regulation of appetitive behaviour, body weight and glucose homeostasis. *J Neuroendocrinol*, 32, e12805.
- LEAR, S. A., HU, W., RANGARAJAN, S., GASEVIC, D., LEONG, D., IQBAL, R., CASANOVA, A., SWAMINATHAN, S., ANJANA, R. M., KUMAR, R., et al. 2017. The effect of physical activity on mortality and cardiovascular disease in 130 000 people from 17 high-income, middle-income, and low-income countries: the PURE study. *Lancet*, 390, 2643-54.
- LEE, E. S., UHM, K. O., LEE, Y. M., KWON, J., PARK, S. H. & SOO, K. H. 2008. Oxytocin stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells through the calcium-CaMKK-AMPK pathway. *Regul Pept*, 151, 71-4.
- LEE, J. Y., HAN, S. H., PARK, M. H., BAEK, B., SONG, I. S., CHOI, M. K., TAKUWA, Y., RYU, H., KIM, S. H., HE, X., et al. 2018. Neuronal SphK1 acetylates COX2 and contributes to pathogenesis in a model of Alzheimer's Disease. *Nat Commun*, 9, 1479.
- LEEK, J. T., TAUB, M. A. & RASGON, J. L. 2012. A statistical approach to selecting and confirming validation targets in -omics experiments. *BMC Bioinformatics*, 13, 150.

- LEIGH, S. J., KAAKOUSH, N. O., ESCORIHUELA, R. M., WESTBROOK, R. F. & MORRIS, M. J. 2020. Treadmill exercise has minimal impact on obesogenic diet-related gut microbiome changes but alters adipose and hypothalamic gene expression in rats. *Nutr Metab (Lond)*, 17, 71.
- LI, T., WEI, S., SHI, Y., PANG, S., QIN, Q., YIN, J., DENG, Y., CHEN, Q., WEI, S., NIE, S., et al. 2016. The dose-response effect of physical activity on cancer mortality: findings from 71 prospective cohort studies. *Br J Sports Med*, 50, 339-45.
- LIN, J. Y., KUO, W. W., BASKARAN, R., KUO, C. H., CHEN, Y. A., CHEN, W. S., HO, T. J., DAY, C. H., MAHALAKSHMI, B. & HUANG, C. Y. 2020. Swimming exercise stimulates IGF1/ PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. *Aging (Albany NY)*, 12, 6852-64.
- LIST, E. O., BERRYMAN, D. E., FUNK, K., JARA, A., KELDER, B., WANG, F., STOUT, M. B., ZHI, X., SUN, L., WHITE, T. A., et al. 2014. Liver-specific GH receptor gene-disrupted (LiGHRKO) mice have decreased endocrine IGF-I, increased local IGF-I, and altered body size, body composition, and adipokine profiles. *Endocrinology*, 155, 1793-805.
- LIU, Y., SHU, X. O., WEN, W., SAITO, E., RAHMAN, M. S., TSUGANE, S., TAMAKOSHI, A., XIANG, Y. B., YUAN, J. M., GAO, Y. T., et al. 2018. Association of leisure-time physical activity with total and cause-specific mortality: a pooled analysis of nearly a half million adults in the Asia Cohort Consortium. *Int J Epidemiol*, 47, 771-9.
- LØTVEDT, P., FALLAHS SHAHROUDI, A., BEKTIC, L., ALTIMIRAS, J. & JENSEN, P. 2017. Chicken domestication changes expression of stress-related genes in brain, pituitary and adrenals. *Neurobiol Stress*, 7, 113-21.
- LOWE, R., SHIRLEY, N., BLEACKLEY, M., DOLAN, S. & SHAFEE, T. 2017. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol*, 13, e1005457.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2015. Histologie. *Georg-Thieme-Verlag*, 5. Auflage.
- MAGISTRETTI, P. J. & ALLAMAN, I. 2015. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron*, 86, 883-901.
- MAGOMEDOVA, L. & CUMMINS, C. L. 2016. Glucocorticoids and Metabolic Control. *Handb Exp Pharmacol*, 233, 73-93.
- MAHLER CONVENOR, M., BERARD, M., FEINSTEIN, R., GALLAGHER, A., ILLGEN-WILCKE, B., PRITCHETT-CORNING, K. & RASPA, M. 2014. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, 48, 178-92.
- MANI, B. K., CASTORENA, C. M., OSBORNE-LAWRENCE, S., VIJAYARAGHAVAN, P., METZGER, N. P., ELMQUIST, J. K. & ZIGMAN, J. M. 2018. Ghrelin mediates exercise endurance and the feeding response post-exercise. *Mol Metab*, 9, 114-130.
- MARKAN, K. R., BOLAND, L. K., KING-MCALPIN, A. Q., CLAFLIN, K. E., LEAMAN, M. P., KEMERLING, M. K., STONEWALL, M. M., AMENDT, B. A., ANKRUM, J. A. & POTTHOFF, M. J. 2020. Adipose TBX1 regulates beta-adrenergic sensitivity in subcutaneous adipose tissue and thermogenic capacity in vivo. *Mol Metab*, 36, 100965.
- MASSETT, M. P., FAN, R. & BERK, B. C. 2009. Quantitative trait loci for exercise training responses in FVB/NJ and C57BL/6J mice. *Physiol Genomics*, 40, 15-22.
- MASTORAKOS, G. & PAVLATOU, M. 2005. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Horm Metab Res*, 37, 577-84.
- MCCORMACK, S. E., BLEVINS, J. E. & LAWSON, E. A. 2020. Metabolic Effects of Oxytocin. *Endocr Rev*, 41, 121-45.
- MCTIERNAN, A., FRIEDENREICH, C. M., KATZMARZYK, P. T., POWELL, K. E., MACKO, R., BUCHNER, D., PESCATELLO, L. S., BLOODGOOD, B., TENNANT, B., VAUX-BJERKE, A., et al. 2019. Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review. *Med Sci Sports Exerc*, 51, 1252-61.

- MITCHELL, R. W., ON, N. H., DEL BIGLIO, M. R., MILLER, D. W. & HATCH, G. M. 2011. Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem*, 117, 735-46.
- MOTTILLO, S., FILION, K. B., GENEST, J., JOSEPH, L., PILOTE, L., POIRIER, P., RINFRET, S., SCHIFFRIN, E. L. & EISENBERG, M. J. 2010. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, 56, 1113-32.
- NINDL, B. C., PIERCE, J. R., RARICK, K. R., TUCKOW, A. P., ALEMANY, J. A., SHARP, M. A., KELLOGG, M. D. & PATTON, J. F. 2014. Twenty-hour growth hormone secretory profiles after aerobic and resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 46, 1917-27.
- ODLE, A. K., ALLENSWORTH-JAMES, M. L., AKHTER, N., SYED, M., HANEY, A. C., MACNICOL, M., MACNICOL, A. M. & CHILDS, G. V. 2016. A Sex-Dependent, Tropic Role for Leptin in the Somatotrope as a Regulator of POU1F1 and POU1F1-Dependent Hormones. *Endocrinology*, 157, 3958-71.
- OHDE, D., BRENMÖHL, J., WALZ, C., TUCHSCHERER, A., WIRTHGEN, E. & HOEFLICH, A. 2016a. Comparative analysis of hepatic miRNA levels in male marathon mice reveals a link between obesity and endurance exercise capacities. *J Comp Physiol B*, 186, 1067-78.
- OHDE, D., MOELLER, M., BRENMÖHL, J., WALZ, C., PONSUKSILI, S., SCHWERIN, M., FUELLEN, G. & HOEFLICH, A. 2016b. Advanced Running Performance by Genetic Predisposition in Male Dummerstorf Marathon Mice (DUhTP) Reveals Higher Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) Related mRNA Expression in the Liver and Higher Serum Levels of Progesterone. *PLoS One*, 11, e0146748.
- ONAKA, T., TAKAYANAGI, Y. & YOSHIDA, M. 2012. Roles of oxytocin neurones in the control of stress, energy metabolism, and social behaviour. *J Neuroendocrinol*, 24, 587-98.
- OOSTHUYSE, T. & BOSCH, A. N. 2010. The effect of the menstrual cycle on exercise metabolism: implications for exercise performance in eumenorrhoeic women. *Sports Med*, 40, 207-27.
- PARK, D. R., NAM, T. S., KIM, Y. W., LEE, S. H. & KIM, U. H. 2018. CD38-cADPR-SERCA Signaling Axis Determines Skeletal Muscle Contractile Force in Response to β -Adrenergic Stimulation. *Cell Physiol Biochem*, 46, 2017-30.
- PARK, E., CHAN, O., LI, Q., KIRALY, M., MATTHEWS, S. G., VRANIC, M. & RIDDELL, M. C. 2005. Changes in basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity during exercise training are centrally mediated. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, R1360-71.
- PATIL, M. J., HENRY, M. A. & AKOPIAN, A. N. 2014. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin)*, 8, 193-202.
- PERIC, R., MEUCCI, M. & NIKOLOVSKI, Z. 2016. Fat Utilization During High-Intensity Exercise: When Does It End? *Sports Med Open*, 2, 35.
- PERTEA, M., KIM, D., PERTEA, G. M., LEEK, J. T. & SALZBERG, S. L. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc*, 11, 1650-67.
- PIETRELLI, A., DI NARDO, M., MASUCCI, A., BRUSCO, A., BASSO, N. & MATKOVIC, L. 2018. Lifelong Aerobic Exercise Reduces the Stress Response in Rats. *Neuroscience*, 376, 94-107.
- POPOVIC, B., POPOVIC, D., MACUT, D., ANTIC, I. B., ISAILOVIC, T., OGNJANOVIC, S., BOGAVAC, T., KOVACEVIC, V. E., ILIC, D., PETROVIC, M., et al. 2019. Acute Response to Endurance Exercise Stress: Focus on Catabolic/anabolic Interplay Between Cortisol, Testosterone, and Sex Hormone Binding Globulin in Professional Athletes. *J Med Biochem*, 38, 6-12.
- PRENTICE, K. J., SAKSI, J. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2019. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *J Lipid Res*, 60, 734-40.
- PUCHALSKA, P. & CRAWFORD, P. A. 2017. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab*, 25, 262-84.
- PURDOM, T., KRAVITZ, L., DOKLADNY, K. & MERMIER, C. 2018. Understanding the factors that effect maximal fat oxidation. *J Int Soc Sports Nutr*, 15, 3.

- RAJKUMAR, A. P., QVIST, P., LAZARUS, R., LESCAI, F., JU, J., NYEGAARD, M., MORS, O., BØRGLUM, A. D., LI, Q. & CHRISTENSEN, J. H. 2015. Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. *BMC Genomics*, 16, 548.
- RAMOS, A. T., TUFIK, S. & TRONCONE, L. R. 2016. Control of Stress-Induced ACTH Secretion by Vasopressin and CRH: Additional Evidence. *Neuropsychobiology*, 73, 184-90.
- RIBEIRO, M. O., BIANCO, S. D., KANESHIGE, M., SCHULTZ, J. J., CHENG, S. Y., BIANCO, A. C. & BRENT, G. A. 2010. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, 151, 432-40.
- RICHTER, O. N., KÜBLER, K., SCHMOLLING, J., KUPKA, M., REINSBERG, J., ULRICH, U., VAN DER VEN, H., WARDELMANN, E. & VAN DER VEN, K. 2004. Oxytocin receptor gene expression of estrogen-stimulated human myometrium in extracorporeally perfused non-pregnant uteri. *Mol Hum Reprod*, 10, 339-46.
- ROBINSON, M. D., MCCARTHY, D. J. & SMYTH, G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 139-40.
- RODRIGUES DE ARAUJO, V., LISBOA, P., BOAVENTURA, G., CARAMAZ, F., PIRES, L., OLIVEIRA, E., MOURA, E. & CASIMIRO-LOPES, G. 2018. Acute high-intensity exercise test in soccer athletes affects salivary biochemical markers. *Free Radic Res*, 52, 850-5.
- ROFE, A. M. & WILLIAMSON, D. H. 1983. Metabolic effects of vasopressin infusion in the starved rat. Reversal of ketonaemia. *Biochem J*, 212, 231-9.
- ROMIJN, J. A., KLEIN, S., COYLE, E. F., SIDOSSIS, L. S. & WOLFE, R. R. 1993. Strenuous endurance training increases lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling at rest. *J Appl Physiol (1985)*, 75, 108-13.
- RUEGSEGG, G. N., GRIGSBY, K. B., KELTY, T. J., ZIDON, T. M., CHILDS, T. E., VIEIRA-POTTER, V. J., KLINKEBIEL, D. L., MATHENY, M., SCARPACE, P. J. & BOOTH, F. W. 2017. Maternal Western diet age-specifically alters female offspring voluntary physical activity and dopamine- and leptin-related gene expression. *Faseb j*, 31, 5371-83.
- RUIJTER, J. M., LORENZ, P., TUOMI, J. M., HECKER, M. & VAN DEN HOFF, M. J. 2014. Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Mikrochim Acta*, 181, 1689-96.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- SAKASHITA, M., NAKAMURA, U., HORIE, N., YOKOYAMA, Y., KIM, M. & FUJITA, S. 2019. Oral Supplementation Using Gamma-Aminobutyric Acid and Whey Protein Improves Whole Body Fat-Free Mass in Men After Resistance Training. *J Clin Med Res*, 11, 428-34.
- SALAME, S., GARCIA, P. C., REAL, C. C., BORBOREMA, J., MOTA-ORTIZ, S. R., BRITTO, L. R. & PIRES, R. S. 2016. Distinct neuroplasticity processes are induced by different periods of acrobatic exercise training. *Behav Brain Res*, 308, 64-74.
- SALMON, W. D., JR. & DAUGHADAY, W. H. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med*, 49, 825-36.
- SARMENTO-CABRAL, A., PEINADO, J. R., HALLIDAY, L. C., MALAGON, M. M., CASTANO, J. P., KINEMAN, R. D. & LUQUE, R. M. 2017. Adipokines (Leptin, Adiponectin, Resistin) Differentially Regulate All Hormonal Cell Types in Primary Anterior Pituitary Cell Cultures from Two Primate Species. *Sci Rep*, 7, 43537.
- SARVARI, M., KALLO, I., HRABOVSKY, E., SOLYMOSI, N., RODOLOSSE, A., VASTAGH, C., AUER, H. & LIPOSITS, Z. 2015. Hippocampal Gene Expression Is Highly Responsive to Estradiol Replacement in Middle-Aged Female Rats. *Endocrinology*, 156, 2632-45.
- SATO, K., IEMITSU, M., KATAYAMA, K., ISHIDA, K., KANAO, Y. & SAITO, M. 2016. Responses of sex steroid hormones to different intensities of exercise in endurance athletes. *Exp Physiol*, 101, 168-75.

- SCHEMA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W. & BROWN, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-70.
- SCHENK, S. & HOROWITZ, J. F. 2006. Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E254-60.
- SCHIENKIEWITZ, A., MENSINK, G., KUHNERT, R. & LANGE, C. 2017. Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung. *Journal of Health Monitoring*, 2, 21-8.
- SCHMILL, M. P., CADNEY, M. D., THOMPSON, Z., HIRAMATSU, L., ALBUQUERQUE, R. L., MCNAMARA, M. P., CASTRO, A. A., KAY, J. C., BUENAVENTURA, D. G., RAMIREZ, J. L., et al. 2021. Conditioned place preference for cocaine and methylphenidate in female mice from lines selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. *Genes Brain Behav*, 20, e12700.
- SCHREIHOFFER, D. A., STOLER, M. H. & SHUPNIK, M. A. 2000. Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology*, 141, 2174-84.
- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- SCHUMANN, T., KONIG, J., HENKE, C., WILLMES, D. M., BORNSTEIN, S. R., JORDAN, J., FROMM, M. F. & BIRKENFELD, A. L. 2020. Solute Carrier Transporters as Potential Targets for the Treatment of Metabolic Disease. *Pharmacol Rev*, 72, 343-79.
- SERRATÌ, S., DE SUMMA, S., PILATO, B., PETRIELLA, D., LACALAMITA, R., TOMMASI, S. & PINTO, R. 2016. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *Oncotargets Ther*, 9, 7355-65.
- SHEN, Y., HUANG, G., MCCORMICK, B. P., SONG, T. & XU, X. 2017. Effects of high-intensity interval versus mild-intensity endurance training on metabolic phenotype and corticosterone response in rats fed a high-fat or control diet. *PLoS One*, 12, e0181684.
- SHIRAKI, T., KONDO, S., KATAYAMA, S., WAKI, K., KASUKAWA, T., KAWAJI, H., KODZIUS, R., WATAHIKI, A., NAKAMURA, M., ARAKAWA, T., et al. 2003. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15776-81.
- SIMONI, M., WEINBAUER, G. F., GROMOLL, J. & NIESCHLAG, E. 1999. Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol (Paris)*, 60, 102-6.
- SINGLETON, J. M. & GARLAND, T., JR. 2019. Influence of corticosterone on growth, home-cage activity, wheel running, and aerobic capacity in house mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. *Physiol Behav*, 198, 27-41.
- SINHA, R. A., SINGH, B. K. & YEN, P. M. 2018. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 14, 259-69.
- SMITH, C. J. & OSBORN, A. M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 67, 6-20.
- ST-AMAND, J., YOSHIOKA, M., TANAKA, K. & NISHIDA, Y. 2011. Transcriptome-wide identification of preferentially expressed genes in the hypothalamus and pituitary gland. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2, 111.
- STEPHAN, A. B., SHUM, E. Y., HIRSH, S., CYGNAR, K. D., REISERT, J. & ZHAO, H. 2009. ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 11776-81.
- STEPHENS, F. B., CONSTANTIN-TEODOSIU, D. & GREENHAFF, P. L. 2007. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol*, 581, 431-44.
- SUPPLITT, S., KARPINSKI, P., SASIADEK, M. & LACZMANSKA, I. 2021. Current Achievements and Applications of Transcriptomics in Personalized Cancer Medicine. *Int J Mol Sci*, 22, 1422.

- SWALLOW, J. G., CARTER, P. A. & GARLAND, T., JR. 1998. Artificial selection for increased wheel-running behavior in house mice. *Behav Genet*, 28, 227-37.
- TAKIMOTO, M. & HAMADA, T. 2014. Acute exercise increases brain region-specific expression of MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1, and COX IV proteins. *J Appl Physiol (1985)*, 116, 1238-50.
- TANAKA, H., SHIMIZU, N. & YOSHIKAWA, N. 2017. Role of skeletal muscle glucocorticoid receptor in systemic energy homeostasis. *Exp Cell Res*, 360, 24-6.
- TANOUE, A., ITO, S., HONDA, K., OSHIKAWA, S., KITAGAWA, Y., KOSHIMIZU, T. A., MORI, T. & TSUJIMOTO, G. 2004. The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J Clin Invest*, 113, 302-9.
- TREMBLAY, J. J. & DROUIN, J. 1999. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Mol Cell Biol*, 19, 2567-76.
- TREPEL, M. 2017. Neuroanatomie, Struktur und Funktion. Elsevier-Verlag, 7. Auflage.
- TRIBOLLET, E., AUDIGIER, S., DUBOIS-DAUPHIN, M. & DREIFUSS, J. J. 1990. Gonadal steroids regulate oxytocin receptors but not vasopressin receptors in the brain of male and female rats. An autoradiographical study. *Brain Res*, 511, 129-40.
- TROJNAR, M., PATRO-MAŁYSZA, J., KIMBER-TROJNAR, Ż., LESZCZYŃSKA-GORZELAK, B. & MOSIEWICZ, J. 2019. Associations between Fatty Acid-Binding Protein 4-A Proinflammatory Adipokine and Insulin Resistance, Gestational and Type 2 Diabetes Mellitus. *Cells*, 8, 227.
- TUTTLE, A. H., PHILIP, V. M., CHESLER, E. J. & MOGIL, J. S. 2018. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat Methods*, 15, 994-6.
- TWELLMAYER, J. 2007. Etablierung der DNA-Mikroarray-Transkriptom-Analyse für Halobacterium salinarum R1. Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität München. doi: 10.5282/edoc.6634.
- URIBE, R. M., JAIMES-HOY, L., RAMÍREZ-MARTÍNEZ, C., GARCÍA-VÁZQUEZ, A., ROMERO, F., CISNEROS, M., COTE-VÉLEZ, A., CHARLI, J. L. & JOSEPH-BRAVO, P. 2014. Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology*, 155, 2020-30.
- VAN DEN BEUKEL, J. C., GREFFHORST, A., QUARTA, C., STEENBERGEN, J., MASTROBERARDINO, P. G., LOMBES, M., DELHANTY, P. J., MAZZA, R., PAGOTTO, U., VAN DER LELY, A. J., et al. 2014. Direct activating effects of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on brown adipose tissue are attenuated by corticosterone. *FASEB J*, 28, 4857-67.
- VAN DER KLOET, F. M., BUURMANS, J., JONKER, M. J., SMILDE, A. K. & WESTERHUIS, J. A. 2020. Increased comparability between RNA-Seq and microarray data by utilization of gene sets. *PLoS Comput Biol*, 16, e1008295.
- VAN HALL, G. 2015. The Physiological Regulation of Skeletal Muscle Fatty Acid Supply and Oxidation During Moderate-Intensity Exercise. *Sports Med*, 45 Suppl 1, S23-32.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3, Research0034.
- VELCULESCU, V. E., ZHANG, L., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science*, 270, 484-7.
- VINGREN, J. L., BUDNAR, R. G., JR., MCKENZIE, A. L., DUPLANTY, A. A., LUK, H. Y., LEVITT, D. E. & ARMSTRONG, L. E. 2016. The acute testosterone, growth hormone, cortisol and interleukin-6 response to 164-km road cycling in a hot environment. *J Sports Sci*, 34, 694-9.
- VOSS, S. C., NIKOLOVSKI, Z., BOURDON, P. C., ALSAYRAFI, M. & SCHUMACHER, Y. O. 2016. The effect of cumulative endurance exercise on leptin and adiponectin and their role as markers to monitor training load. *Biol Sport*, 33, 23-8.
- WALZ, C., BRENMÖHL, J., TRAKOOLJUL, N., NOCE, A., CAFFIER, C., OHDE, D., LANGHAMMER, M., WIMMERS, K., PONSUKSILI, S. & HOEFELICH, A. 2021. Control of Protein and Energy Metabolism in the Pituitary Gland in Response to Three-Week Running Training in Adult Male Mice. *Cells*, 10, 736.

- WANG, D. D., LI, W. G. & ZHANG, Y. Y. 2016. Association of CD36 expression and polymorphism with serum biochemical indices in Cherry Valley duck. *Genet Mol Res*, 15, 1-10.
- WANG, R., ZHANG, L., YIN, D., MUFSON, R. A. & SHI, Y. 1998. Protein kinase C regulates Fas (CD95/APO-1) expression. *J Immunol*, 161, 2201-7.
- WARDLAW, S. L. 2011. Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance. *Eur J Pharmacol*, 660, 213-9.
- WASINSKI, F., FRAZAO, R. & DONATO, J., JR. 2019. Effects of growth hormone in the central nervous system. *Arch Endocrinol Metab*, 63, 549-56.
- WIT, J. M., OOSTDIJK, W., LOSEKOOT, M., VAN DUYNENVOORDE, H. A., RUIVENKAMP, C. A. & KANT, S. G. 2016. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Novel genetic causes of short stature. *Eur J Endocrinol*, 174, R145-73.
- WITTWER, C. T., HERRMANN, M. G., MOSS, A. A. & RASMUSSEN, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22, 130-8.
- WU, S., TSAI, M., WONG, S., HSIEH-LI, H., TSAI, T., CHANG, W., HUANG, S., CHIU, C. & WANG, S. 2010. Characterization of genomic structures and expression profiles of three tandem repeats of a mouse double homeobox gene: Duxbl. *Dev Dyn*, 239, 927-40.
- WU, W., BAKER, M. E., ERALY, S. A., BUSH, K. T. & NIGAM, S. K. 2009. Analysis of a large cluster of SLC22 transporter genes, including novel USTs, reveals species-specific amplification of subsets of family members. *Physiol Genomics*, 38, 116-24.
- XU, H., CUPPLES, L. A., STOKES, A. & LIU, C. T. 2018. Association of Obesity With Mortality Over 24 Years of Weight History: Findings From the Framingham Heart Study. *JAMA Netw Open*, 1, e184587.
- YILMAZ, A. & GROTEWOLD, E. 2010. Components and mechanisms of regulation of gene expression. *Methods Mol Biol*, 674, 23-32.
- YOUNIS, S., SCHONKE, M., MASSART, J., HJORTEBJERG, R., SUNDSTROM, E., GUSTAFSON, U., BJORNHOLM, M., KROOK, A., FRYSTYK, J., ZIERATH, J. R., et al. 2018. The ZBED6-IGF2 axis has a major effect on growth of skeletal muscle and internal organs in placental mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E2048-E57.
- YU, N., RUAN, Y., GAO, X. & SUN, J. 2017. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials on the Effect of Exercise on Serum Leptin and Adiponectin in Overweight and Obese Individuals. *Horm Metab Res*, 49, 164-73.
- YÜKSEL, O., ATEŞ, M., KIZILDAĞ, S., YÜCE, Z., KOÇ, B., KANDIŞ, S., GÜVENDİ, G., KARAKILIÇ, A., GÜMÜŞ, H. & UYSAL, N. 2019. Regular Aerobic Voluntary Exercise Increased Oxytocin in Female Mice: The Cause of Decreased Anxiety and Increased Empathy-Like Behaviors. *Balkan Med J*, 36, 257-62.
- ZANJANI, F. S., GAENI, A. A., ARAS, D. & AKALAN, C. 2019. The effect of strength and endurance training on SSTR2 and SSTR5 in patients with colorectal cancer. *J Exerc Rehabil*, 15, 622-7.
- ZHANG, P., RHODES, J. S., GARLAND, T., JR., PEREZ, S. D., SOUTHEY, B. R. & RODRIGUEZ-ZAS, S. L. 2018. Brain region-dependent gene networks associated with selective breeding for increased voluntary wheel-running behavior. *PLoS One*, 13, e0201773.
- ZHANG, X., FITZSIMMONS, R. L., CLELAND, L. G., EY, P. L., ZANNETTINO, A. C., FARMER, E. A., SINCOCK, P. & MAYRHOFFER, G. 2003. CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1. *Lab Invest*, 83, 317-32.
- ZHONG, J., AMINA, S., LIANG, M., AKTHER, S., YUHI, T., NISHIMURA, T., TSUJI, C., TSUJI, T., LIU, H. X., HASHII, M., et al. 2016. Cyclic ADP-Ribose and Heat Regulate Oxytocin Release via CD38 and TRPM2 in the Hypothalamus during Social or Psychological Stress in Mice. *Front Neurosci*, 10, 304.
- ZIEBA, D. A., BIERNAT, W. & BARC, J. 2020. Roles of leptin and resistin in metabolism, reproduction, and leptin resistance. *Domest Anim Endocrinol*, 73, 106472.
- ZIEGLER, G. C., ALMOS, P., MCNEILL, R. V., JANSCH, C. & LESCH, K. P. 2020. Cellular effects and clinical implications of SLC2A3 copy number variation. *J Cell Physiol*, 235, 9021-36.

ZUBERI, A. & LUTZ, C. 2016. Mouse Models for Drug Discovery. Can New Tools and Technology Improve Translational Power? *Ilar j*, 57, 178-85.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als
≥	größer gleich
=	gleich
-	bis
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
a	Anstieg
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ANO2	Anoktamin 2
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP13A5	ATPase 13 A5
AVPR1B	Vasopressin Rezeptor 1b
BCV	<i>biological coefficient of variation</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CAMK2A	Kalziumkalmodulin-abhängige Proteinkinase 2A
CAMKV	CaM Kinase-ähnliches Vesikel-assoziiertes Protein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBX3-ps7	Chromobox 3 Pseudogen 7
CCL2	CC-Chemokin Ligand 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDH22	Cadherin 22
cDNA	komplementäre DNA
CHIA1	Chitinase 1
CLDN19	Claudin 19
cm	Zentimeter
COL3A1	Kollagen Typ 3 Kette A1
cpm	<i>counts per million</i>
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
CRABP1	Zelluläres Retinsäure-bindendes Protein 1
CREB3L1	<i>cAMP-responsive element-binding protein 3-like 1</i>
CRH	<i>corticotropin-releasing hormone</i>
CRHR1	<i>corticotropin-releasing hormone</i> Rezeptor 1
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAG Expression	Data Analysis Gene Expression

DEG	differentiell exprimiertes Gentranskript
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAH	Dynein
dNTP	Nukleosidtriphosphat
Dr. med.	<i>doctor medicinae</i>
Dr. rer. nat.	<i>doctor rerum naturalium</i>
DUhLB	Dummerstorfer hoch-Laufbandlinie
DUhLB_LB vs oB	DUhLB_Laufband vs ohne Belastung
DUhLB vs DUK_LB	DUhLB vs DUK_Laufband
DUhLB vs DUK_oB	DUhLB vs DUK_ohne Belastung
DUK	Dummerstorfer Kontrolllinie
DUK_LB vs oB	DUK_Laufband vs ohne Belastung
DUXBL1	<i>double homeobox B-like 1</i>
E	Effizienz
EGR	<i>early growth response protein</i>
ESR	Östrogenrezeptor
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FABP	Fettsäurebindungsprotein
FAS	Apoptose Antigen 1, Fas-Rezeptor
FBN Dummerstorf	Forschungsinstitut für Nutztierbiologie Dummerstorf
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FN1	Fibronektin 1
FNDC5	<i>fibronectin Type III domain-containing 5</i>
FS	Fettsäuren
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
GABR	Ionotroper GABA-A Rezeptor
GAD1	Glutamatdekarboxylase 1
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GH	<i>growth hormone</i>
GHR	<i>growth hormone</i> Rezeptor
GHRH	<i>growth hormone-releasing hormone</i>
GHRHR	<i>growth hormone-releasing hormone</i> Rezeptor
GHSR	Ghrelinrezeptor
GLUT3	Glukosetransporter 3
GM4804	Glyzaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Pseudogen
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GPR149	G Protein-gekoppelter Rezeptor 149
GRM4	Glutamat metabotroper Rezeptor 4
H2-Q6	Haupthistokompatibilitätskomplex II
H2-Q7	Haupthistokompatibilitätskomplex I
HHL	Hypophysenhinterlappen
HIST	Histon
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
HSL	Hormonsensitive Lipase
HVL	Hypophysenvorderlappen
IFC	<i>integrated fluidic circuit</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IMTAG	intramuskuläre Triazylglyzeride

INSRR	<i>insulin receptor-related protein</i>
IPA®	Ingenuity® Pathway Analysis
KCNJ13	<i>potassium inwardly-rectifying channel subfamily J member 13</i>
kg	Kilogramm
KO	<i>knockout</i>
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
LEPR	Leptinrezeptor
LH	Luteinisierendes Hormon
log	Logarithmus
m	Meter
mcpm	<i>mean</i> cpm
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MYBPC1	Myosin-bindendes Protein C1gr
n	Anzahl
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i>
ng	Nanogramm
NGS	<i>next generation sequencing</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NPHS2	Podozin
OXT	Oxytozin
OXTR	Oxytozinrezeptor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCSK1	Prohormonkonvertase 1/3
PCSK1n	Inhibitorprotein der Prohormonkonvertase 1/3
PD	Privatdozent
PDYN	Prodynorphin
PGC1 α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-Gamma-Koaktivator 1 α
PGK1	Phosphoglyzeratkinase 1
PKC	Proteinkinase C
POMC	Proopiomelanokortin
POU1F1	Hypophysen-spezifischer positiver Transkriptionsfaktor 1
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPP1R17	Proteinphosphatase 1 regulatorische Untereinheit 17
PRL	Prolaktin
Prof.	Professor
ps	Pseudogen
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
R ²	Bestimmtheitsmaß
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
RPL	Ribosomales Protein
RPLP2	Saures Ribosomales 60S-Protein P2

rpm	Runden pro Minute
RPS	Ribosomales Protein S
s	Sekunde
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SERPINA1	Serpin Familie A Mitglied 1
SFRP1	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>
SHISA7	Shisa Familienmitglied 7
Sirt1	Sirtuin 1
SLC	<i>solute carrier</i>
SLFN8	<i>schlafen family member 8</i>
SPHK1	Sphingosinkinase 1
SREBP1	Sterol regulatorisches Element-bindendes Protein 1
SST	Somatostatin
SSTR2	Somatostatin Rezeptor 2
STA	<i>specific target amplification</i> , Präamplifikation
SYT2	Synaptotagmin 2
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TAG	Triazylglyzeride
Tbx1	T-box 1
Tfam	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TGFBR2	<i>transforming growth factor beta receptor 2</i>
TM4SF1	Transmembran 4 L6 Familienmitglied 1
TNFRSF11B	Osteoprotegrin
TRIM5	<i>tripartite motif containing 5</i>
TRPM2	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M member 2</i>
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TSPAN33	Tetraspanin 33
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i> , Thermogenin
V	Volumen
V _{ges}	gesamtes Volumen
V _{O2max}	maximale Sauerstoffaufnahme
vs	versus
VTN	Vitronektin
WNT6	Wnt Familienmitglied 6
x	Mal

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fettsäuremetabolismus bei submaximaler Aktivität (<65% V_{O2max}).....	9
Abbildung 2: Generierung der DUhLB- und DUK-Linien.....	20
Abbildung 3: Studiendesign der vorliegenden Arbeit.	29
Abbildung 4: Probenvorbereitung für RNAseq.	32
Abbildung 5: Benennung der Vergleiche der Mausgruppen.	34
Abbildung 6: Standardkurve.	38
Abbildung 7: Dimensionsreduktion des gesamten NGS-Datensatzes der Hypophyse.	44
Abbildung 8: Genexpressionsunterschiede, die DUhLB-Mäuse ohne Training charakterisieren und die in der Hypophyse von Kontrollmäusen mit Training assoziiert werden konnten.	46
Abbildung 9: Standardkurve zur Primertestung des Primerpaars DUXBL1.	50
Abbildung 10: Korrelation zur Validierung der NGS-Daten.	53
Abbildung 11: ALDH-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse.....	57
Abbildung 12: Geninteraktionsnetzwerk zur ESR1-Regulation in der Hypophyse.....	58
Abbildung 13: Wachstumsfaktor-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse.....	59
Abbildung 14: Geinteraktionsnetzwerk zur NF κ B-Regulation in der Hypophyse.	60
Abbildung 15: <i>Regulator effect</i> zum Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse.	62

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hormone der Hypophyse	11
Tabelle 2: Bekannte Anpassungen im Stoffwechsel der DUHLB-Linie durch Selektion und körperliche Aktivität.....	21
Tabelle 3: Primer zur Messung der Genexpression in der qRT-PCR.....	25
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	27
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	27
Tabelle 6: Verwendete Software	28
Tabelle 7: Ablauf des Trainingsexperiments.....	30
Tabelle 8: Mastermix-Ansatz zur cDNA-Synthese.....	36
Tabelle 9: PCR-Ansatz zur Primertestung.....	37
Tabelle 10: LightCycler qRT-PCR Temperaturprofil.....	37
Tabelle 11: Mastermix für die STA-Reaktion	39
Tabelle 12: Ansatz für die Exonuklease-Reaktion	39
Tabelle 13: Assay-Ansatz für qRT-PCR.....	40
Tabelle 14: Probenansatz für qRT-PCR.....	40
Tabelle 15: qRT-PCR Temperaturprofil.....	40
Tabelle 16: Anzahl DEGs in der Hypophyse im Vergleich der vier Mausgruppen.....	45
Tabelle 17: Genexpressionsunterschiede für ausgewählte SLC-kodierende Gene in der Hypophyse..	48
Tabelle 18: Vergleich der mit NGS- und qRT-PCR-bestimmten Genexpressionsunterschiede.....	51
Tabelle 19: Expressionunterschiede für ausgewählte Gene, die funktionell zu lipolytisch-wirkenden Hypophysenachsen zugeordnet werden können	64

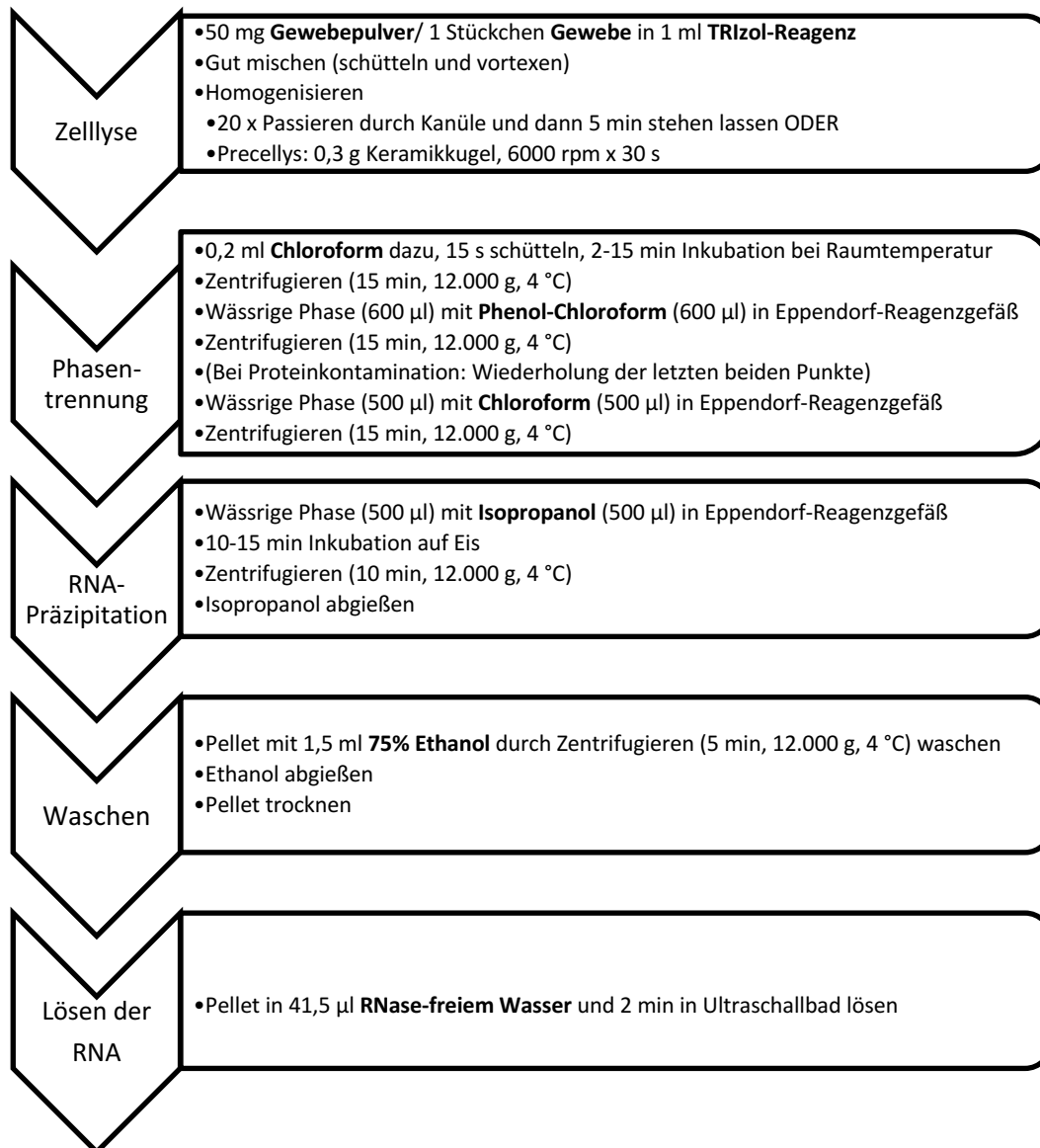
8.4 Verzeichnis der Supplementären Abbildungen

Supplementäre Abbildung 1: RNA-Isolation.....	108
Supplementäre Abbildung 2: RNA-Aufreinigung.....	109
Supplementäre Abbildung 3: Genehmigung über die Verwendung von Abbildungen und Daten aus IPA® im Rahmen von Veröffentlichungen.....	110
Supplementäre Abbildung 4: ALDH-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse.....	111
Supplementäre Abbildung 5: Geninteraktionsnetzwerk zur ESR1 Regulation in der Hypophyse.....	112
Supplementäre Abbildung 6: Wachstumsfaktor-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse.	113
Supplementäre Abbildung 7: Geninteraktionsnetzwerk zur NFκB-Regulation in der Hypophyse.	114

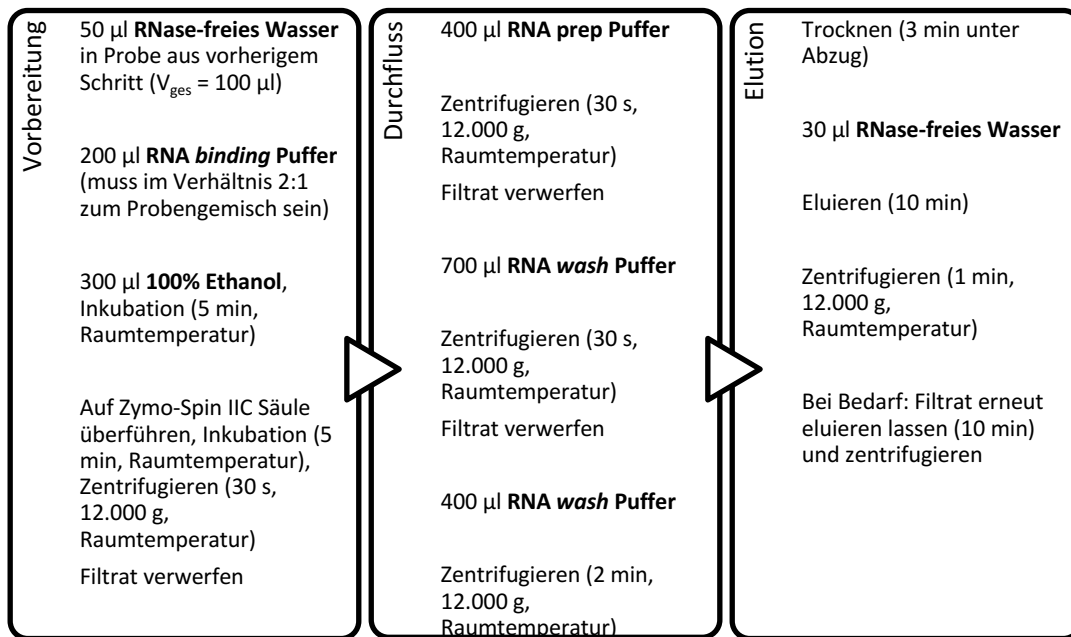
8.5 Verzeichnis der Supplementären Tabellen

Supplementäre Tabelle 1: RNA-Konzentration der Proben aus der Hypophyse und der cDNA-Konzentration nach dem Umschreiben.....	115
Supplementäre Tabelle 2: Wertepaare für die Standardkurve des Primerpaars DUXBL1	116

8.6 Supplementäre Abbildungen



Supplementäre Abbildung 1: RNA-Isolation. Protokoll, unterteilt in fünf Abschnitte mit zugehörigen Durchführungsschritten. Ausgangsprodukt war das Gewebe der Hypophyse der DUHLB- und DUK-Mäuse aus dem Tierexperiment (siehe 3.2.2). Endprodukt war die isolierte RNA. Fettgedruckt sind weitere Zugabeprodukte. µl = Mikroliter, C = Celsius, DUHLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, g = Gramm, mg = Miligramm, min = Minuten, ml = Milliliter, RNA = Ribonukleinsäure, rpm = Runden pro Minute, s = Sekunden



Supplementäre Abbildung 2: RNA-Aufreinigung. Protokoll, unterteilt in drei Abschnitte mit zugehörigen Durchführungsschritten. Ausgangsprodukt war das Gemisch resultierend aus dem DNase-Verdau (siehe 3.2.3). Endprodukt war die aufgereinigte RNA. Fettgedruckt sind weitere Zugabeprodukte. µl = Mikroliter, DNA = Desoxyribonukleinsäure, g = Gramm, min = Minuten, RNA = Ribonukleinsäure, s = Sekunden, V_{ges} = gesamtes Volumen

QIAGEN Bioinformatics Technical Support

May 13, 2020

To whom this may concern:

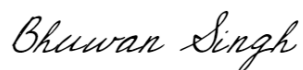
FBN Dummerstorf, Institute of Genome Biology, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf (Germany) has been granted permission by QIAGEN Silicon Valley to use copyrighted figures (both print and digital) generated from QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) for the publication.

Figures and data produced from IPA are available under an open-access CC-BY license for purposes of publication.

If you have any further questions, please contact QIAGEN Bioinformatics Technical Support at ts-bioinformatics@qiagen.com

Best regards,

(on behalf of QIAGEN Silicon Valley)



Bhuwan Singh

Scientist, Advanced Genomics Support

QIAGEN - Sample to Insight

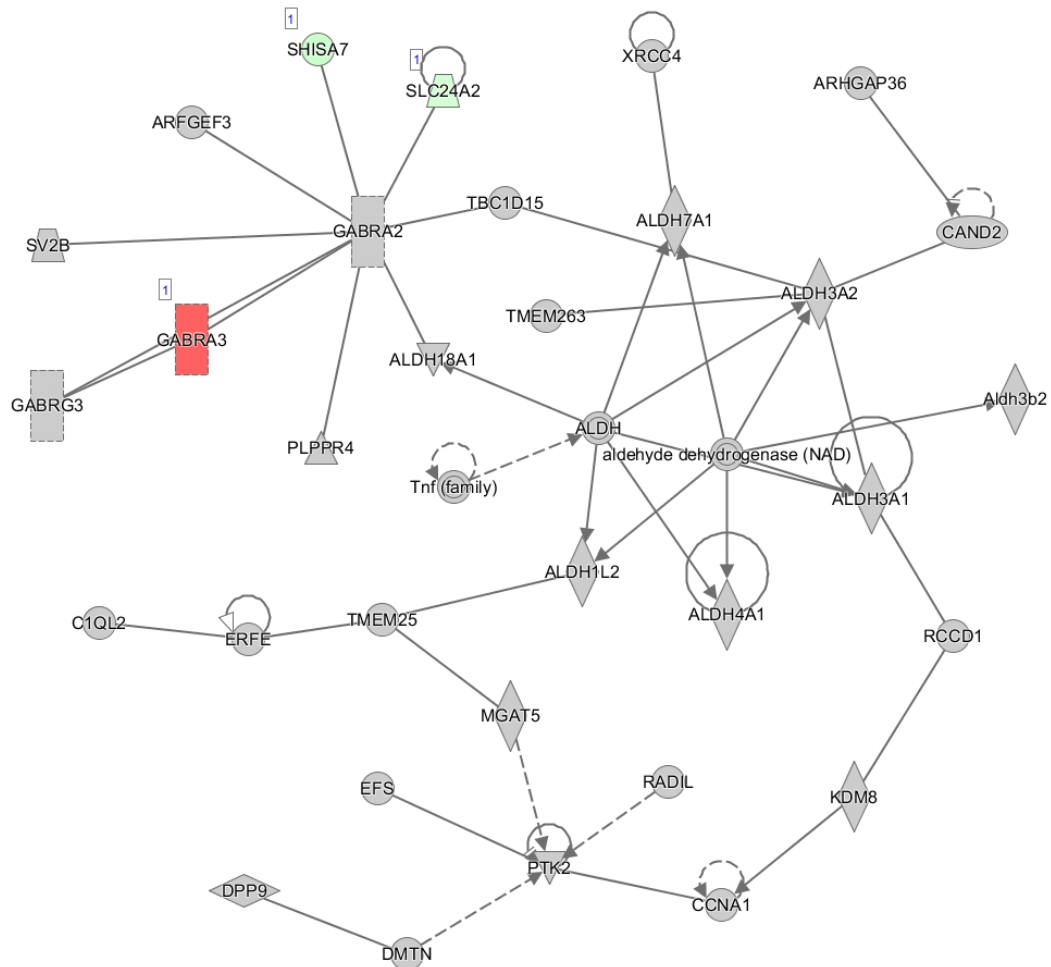
Phone American: +1-866-464-3684 | Danish: +45-80 82 0167

ts-bioinformatics@qiagen.com

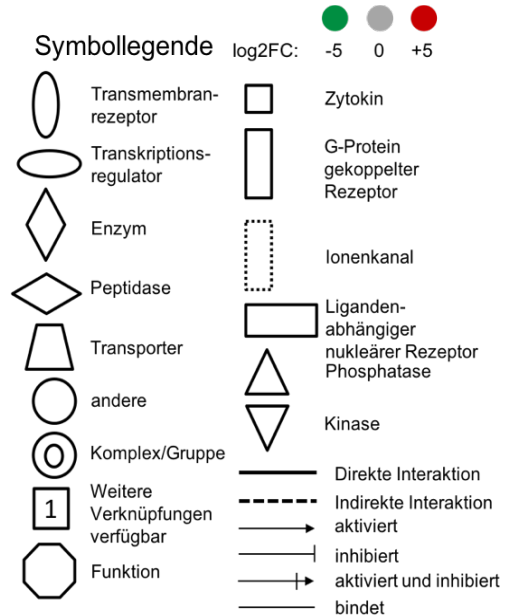
www.qiagenbioinformatics.com

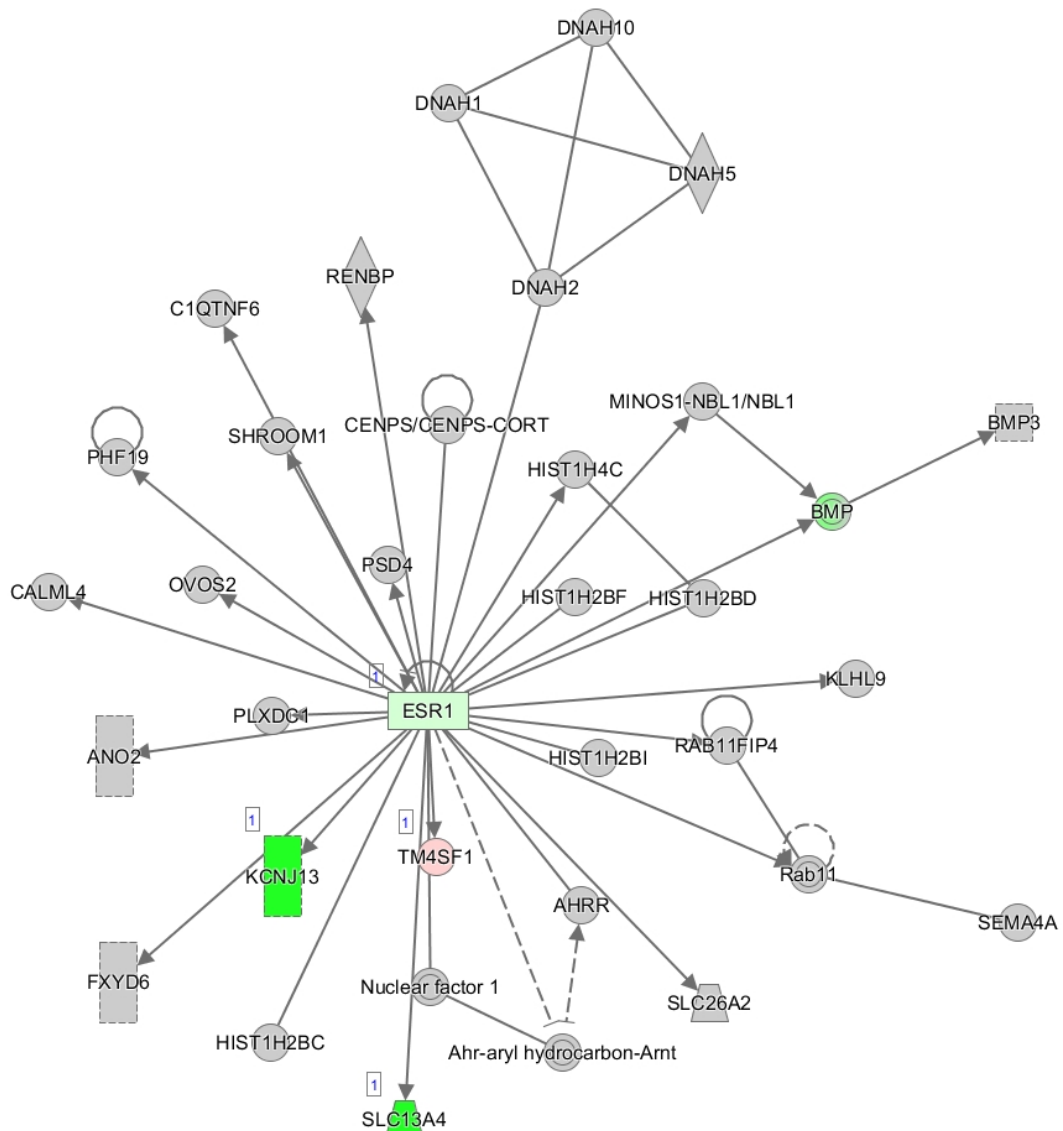
Making improvements in life possible

Supplementäre Abbildung 3: Genehmigung über die Verwendung von Abbildungen und Daten aus IPA® im Rahmen von Veröffentlichungen. IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis

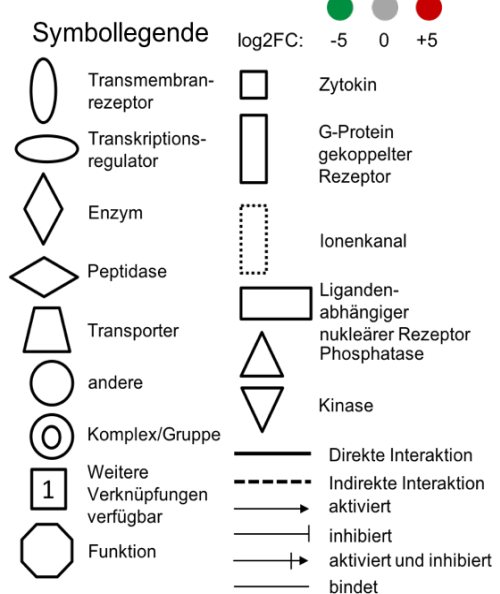


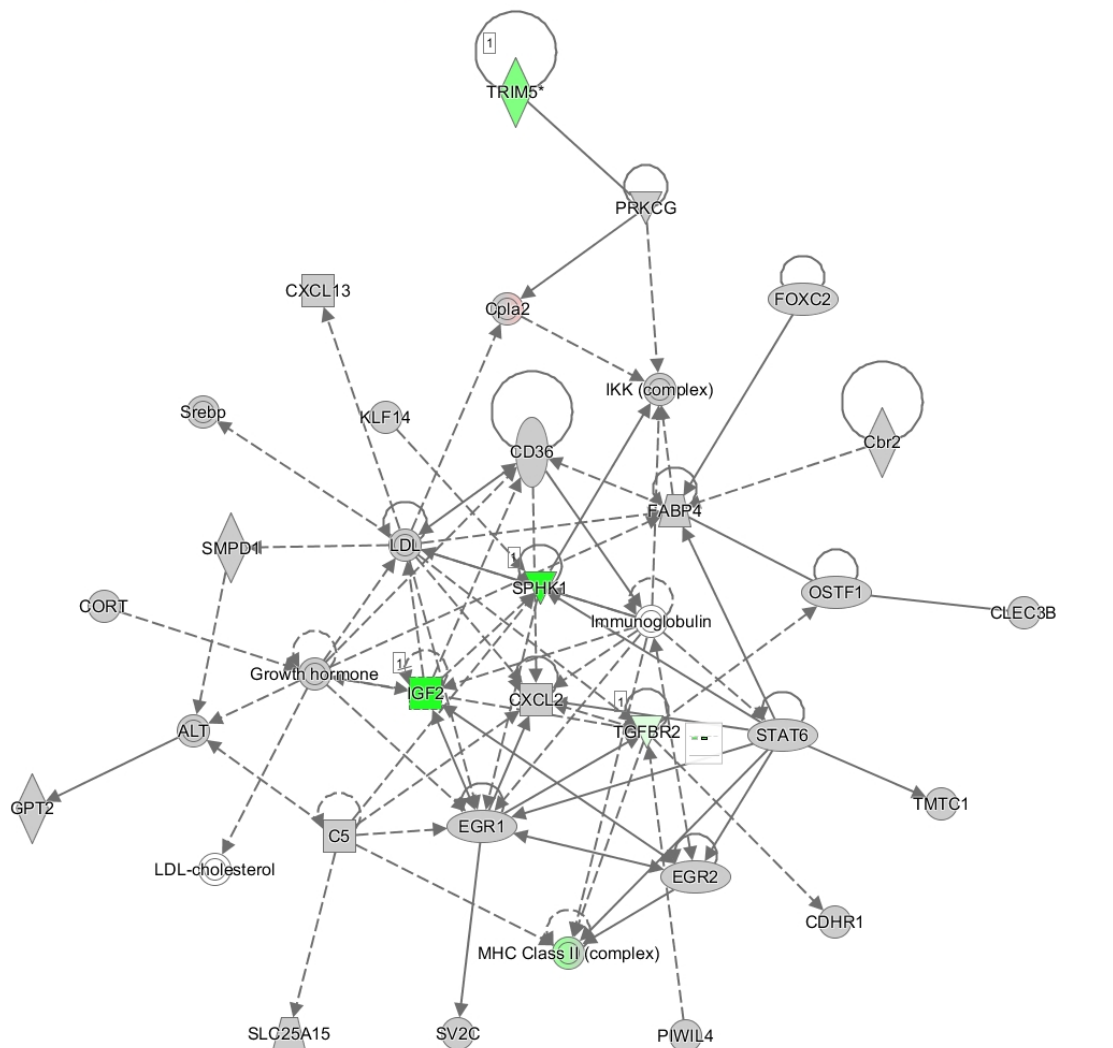
Supplementäre Abbildung 4: ALDH-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse. Geninteraktionsnetzwerk analog zu Abbildung 11 (Abbildung aus IPA®) in der *overlay*-Funktion mit Darstellung des Expressionsunterschieds (log2FC) von ALDH und assoziierter Gene. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt: Grün/rot/grau niedrige/höhere/ keine Expression in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). In trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen waren in diesem Geninteraktionsnetzwerk drei Gene differentiell exprimiert (GABRA3, SHISA7 und SLC24A2) und somit mit dem Training assoziiert. DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, FDR = *false discovery rate*, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung



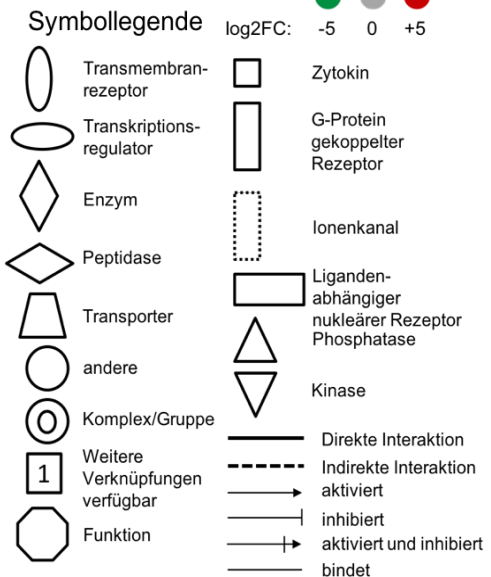


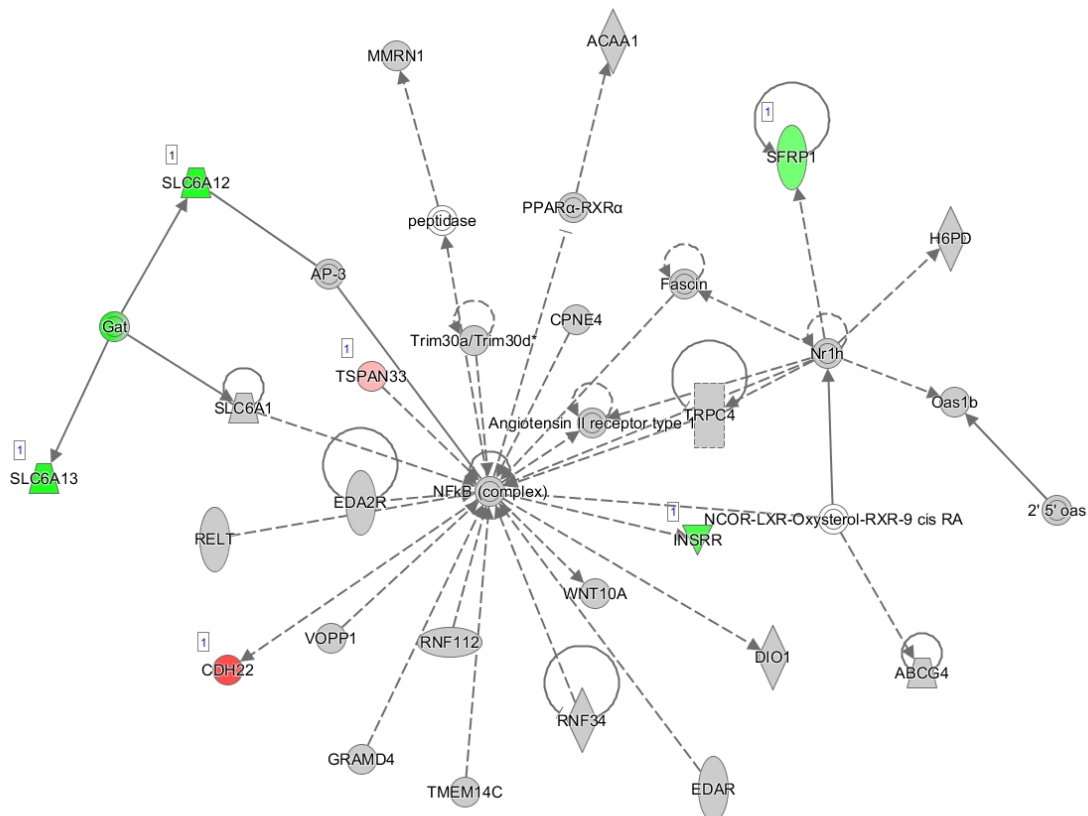
Supplementäre Abbildung 5: Geninteraktionsnetzwerk zur ESR1 Regulation in der Hypophyse. Geninteraktionsnetzwerk analog zu Abbildung 12 (Abbildung aus IPA®) in der *overlay*-Funktion mit Darstellung des Expressionsunterschieds (log2FC) von ESR1 und assoziierter Gene. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt: Grün/rot/grau niedrige/höhere/keine Expression in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). In trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen waren in diesem Geninteraktionsnetzwerk fünf Gene differentiell exprimiert (BMP, ESR1, KCNJ13, SLC13A4, TM4SF1) und somit mit dem Training assoziiert. DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, FDR = *false discovery rate*, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung



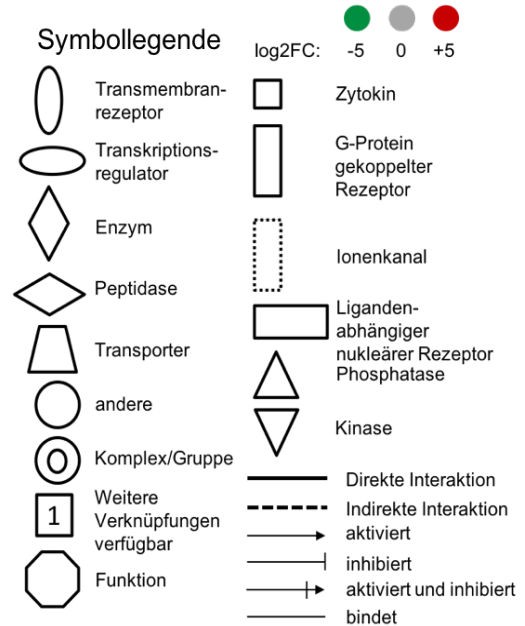


Supplementäre Abbildung 6: Wachstumsfaktor-assoziiertes Geninteraktionsnetzwerk der Hypophyse. Geninteraktionsnetzwerk analog zu Abbildung 13 (Abbildung aus IPA®) in der *overlay*-Funktion mit Darstellung des Expressionsunterschieds (\log_2FC) von Wachstumsfaktoren und assoziierten Genen. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt: Grün/rot/grau niedrige/höhere/keine Expression in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). In trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen waren in diesem Geninteraktionsnetzwerk sechs Gene differentiell exprimiert (CPLA2, IGF2, MHC Komplex, SPHK1, TGFBR2, TRIM5) und somit mit dem Training assoziiert. DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, FDR = *false discovery rate*, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung





Supplementäre Abbildung 7: Geninteraktionsnetzwerk zur NFκB-Regulation in der Hypophyse. Geninteraktionsnetzwerk analog zu Abbildung 14 (Abbildung aus IPA®) in der *overlay*-Funktion mit Darstellung des Expressionsunterschieds (log2FC) des NFκB-Komplexes und assoziierter Gene. Gene sind als Knotenpunkte dargestellt: Grün/rot/grau niedrige/höhere/keine Expression in trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen (DUK_LB vs oB). In trainierten im Vergleich zu untrainierten DUK-Mäusen waren in diesem Geninteraktionsnetzwerk sieben Gene differentiell exprimiert (CDH22, GAT, INSRR, SFRP1, SLC6A12, SLC6A13 und TSPAN33) und somit mit dem Training assoziiert. DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, FC = *fold change*, FDR = *false discovery rate*, IPA® = Ingenuity® Pathway Analysis, LB = Laufband, oB = ohne Belastung



8.7 Supplementäre Tabellen

Supplementäre Tabelle 1: RNA-Konzentration der Proben aus der Hypophyse und der cDNA-Konzentration nach dem Umschreiben

Gruppe	Proben-name	Konzentration Ausgangs-RNA in ng/μl	Konzentration cDNA (RNA-Äquivalent) in ng/μl nach dem Umschreiben
DUK ohne Belastung	H807	125,9	25
	H808	267,4	50
	H809	279,8	50
	H811	468,6	50
	H812	687,0	50
	H813	200,5	25
	H815	397,7	50
	H816	199,9	25
DUK Laufband	H817	71,4	12,5
	H818	333,2	50
	H821	174,3	25
	H823	237,3	25
	H824	211,2	25
	H826	360,3	50
	H827	326,8	50
	H828	314,5	50
DUhLB ohne Belastung	H797	125,2	25
	H798	385,7	50
	H800	113,2	12,5
	H802	195,0	25
	H803	370,1	50
	H804	300,0	50
	H805	326,7	50
	H806	394,7	50
DUhLB Laufband	H785	114,5	12,5
	H788	359,7	50
	H790	270,9	50
	H792	409,8	50
	H793	251,9	50
	H794	313,5	50
	H795	289,9	50
	H796	180,8	25

Darstellung der Ausgangskonzentration der RNA (Isolation siehe 3.2.3) aus den Proben aus der Hypophyse von DUhLB- und DUK-Mäusen. Die Anordnung folgt der Probenzugehörigkeit zu den jeweiligen Gruppen aus dem Trainingsexperiment (DUK/DUhLB ohne Belastung/Laufband). Außerdem Darstellung der Konzentration der cDNA (RNA-Äquivalent) nach dem Umschreiben von RNA in cDNA (siehe 3.2.6.2) für die Validierung der RNAseq-Daten (siehe 3.2.6). Grau ist das Wertepaar der Probe, die aufgrund unzureichender Probenmenge nicht für die Validierung der RNAseq-Daten genutzt werden konnte. μl = Mikroliter, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, DUhLB = Dummerstorfer Mauslinie mit hoher Laufbandleistung, DUK = Dummerstorfer Kontrolllinie, ng = Nanogramm, RNA = Ribonukleinsäure, RNAseq = RNA-Sequenzierung

Supplementäre Tabelle 2: Wertepaare für die Standardkurve des Primerpaars DUXBL1

Konzentration der Verdünnungsreihe in ng/μl	<i>cycle threshold</i> (Ct)
25	25,29
25	25,60
12,5	26,18
12,5	26,50
2,5	29,24
2,5	29,71
1,25	30,48
1,25	29,76
0,25	32,84
0,25	32,05
0,125	33,27
0,125	33,14
0,025	36,91
0,025	35,81
Negativkontrolle (Wasser)	-
Negativkontrolle (Wasser)	-

Darstellung der Stufen der Verdünnungsreihe aus dem cDNA-Pool (siehe 3.2.6.3) zur Testung der Effizienz und Spezifität des Primerpaars für DUXBL1 (siehe 3.2.6.4). Außerdem Darstellung der Ct-Werte für die Amplifikation der cDNA in der PCR. Diese wurden in Abhängigkeit zur jeweiligen Verdünnungsstufe in Doppelbestimmung erhoben. Es zeigte sich ein der Konzentration der cDNA entsprechender Anstieg der Ct-Werte sowie kein deutlicher Ausreißer. Somit konnten alle Ct-Werte für die Erstellung der Standardkurve zur Auswertung der Amplifikation genutzt werden (Abbildung 9). μl = Mikroliter, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, Ct = *cycle threshold*, DUXBL1 = *double homeobox B-like 1*, ng = Nanogramm, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, - = nicht detektierbar innerhalb von 45 Zyklen

8.8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Caroline Charlotte Caffier
Geburtsdatum:	12.06.1997
Geburtsort:	Dresden
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Anschrift:	Eibauer Straße 13 01324 Dresden
Telefon:	+49 15735731206
Email:	caroline.caffier@uni-rostock.de
Familienstand:	Ledig

Schulausbildung

09/2003 bis 08/2007	59. Grundschule Dresden
09/2007 bis 07/2015	Evangelisches Kreuzgymnasium Dresden
	Abschluss: Abitur 2015

Studium

Seit 10/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: September 2017
	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Oktober 2021

Wahlfächer

WS 18/19	Orthopädie
WS 19/20	Echokardiografie
WS 19/20	Sportmedizin und Sportorthopädie
WS 19/20	Transfusionsmedizin

Promotion

Seit 10/2018 Erstellen der Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock, im Rahmen dessen 10/2018 bis 03/2019 praktische Arbeit im Forschungsinstitut für Nutztierbiologie in Dummerstorf

Praktika

06/2012 Zweieinhalbwöchiges Praktikum im Kindergarten „Bühlauer Waldwichtel“ Dresden

09/2015 Einmonatiges Krankenpflegepraktikum im Diakonissenkrankenhaus Dresden

02 bis 03/2016 Einmonatiges Krankenpflegepraktikum im Diakonissenkrankenhaus Dresden

08/2016 Einmonatiges Krankenpflegepraktikum im Krankenhaus St. Joseph-Stift Dresden

02 bis 03/2018 Einmonatige Famulatur, Hausarzt Frank-Michael Elfeld, Dresden

08 bis 09/2018 Einmonatige Famulatur, Städtisches Klinikum Dresden Neustadt, Klinik für Innere Medizin

05/2019 Zweiwöchige Famulatur, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie

06 bis 07/2019 Zweiwöchige Famulatur, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie

08/2019 Einmonatige Famulatur, Chirurgische Gemeinschaftspraxis Dresden Nord

Publikationen

Brenmoehl, J., Walz, C., **Caffier, C.**, Brosig, E., Walz, M., Ohde, D., Trakooljul, N., Langhammer, M., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Zettl, U. K., Höflich, A. 2021. Central suppression of the GH/IGF axis and abrogation of exercise-related mTORC1/2 activation in the muscle of phenotype-selected male marathon mice (DUhTP). Submitted.

Walz C., Brenmoehl, J., Trakooljul, N., Noce, A., **Caffier, C.**, Ohde, D., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Höflich, A. 2021. Control of protein and energy metabolism in the pituitary gland in response to three-week running training in adult male mice. *Cells*, 10, 736.

Besondere Kenntnisse

Sprachen	Deutsch, Muttersprache
	Englisch, flüssig in Sprache und Schrift
	Spanisch, Grundkenntnisse
PC-Kenntnisse	Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)
	Orbis
Kenntnisse in Erster Hilfe (BLS, ALS)	

.....
Ort, Datum

.....
Caroline Charlotte Caffier

8.9 Thesen zur Dissertation

1. Sport stellt einen wichtigen präventiven Faktor bei der Entstehung von Krankheiten, wie beispielsweise (bspw.) metabolischen Erkrankungen, dar. Der Organismus benötigt während sportlicher Aktivität aufgrund des gesteigerten Leistungsumsatzes mehr Energie in Form von Nährstoffen. Da der Stoffwechsel eines Organismus unter der Kontrolle zahlreicher Gewebe und Organe steht, die miteinander über Botenstoffe und Substrate kommunizieren, ist er in der Lage auf Einflüsse, wie bspw. sportliche Aktivität, zu reagieren.
2. Auch die Hypophyse spielt eine wichtige Rolle als am Stoffwechsel beteiligtes Organ. Über die Sekretion von Hormonen, wie *growth hormone* (GH), Adrenokortikotropes Hormon (ACTH) oder Oxytozin (OXT), kann sie Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus unter körperlicher Aktivität nehmen. Die Hormone wirken dabei fettmobilisierend (lipolytisch). Ob auch in der Hypophyse selbst Veränderungen infolge körperlicher Aktivität geschehen, ist bis dato noch nicht ausreichend erforscht.
3. Ziel der Arbeit war die Betrachtung von Genexpressionsunterschieden, die ein Laufbandtraining auf transkriptioneller Ebene in der Hypophyse von Mäusen bewirkt. Es wurde untersucht, ob eine Langzeitselektion nach hoher Laufleistung zu ähnlichen Expressionsunterschieden im Transkriptom führt wie ein dreiwöchiges Laufbandtraining bei nicht-selektierten Kontrollen.
4. Für die Untersuchung wurden Mäuse der auf hohe Laufleistung selektierten Mauslinie DUhLB sowie Mäuse der nicht-selektierten Kontrolllinie DUK gewählt. Jeweils acht DUhLB- und Kontrollmäuse wurden einem dreiwöchigen Trainingsexperiment auf einem Laufband (5x pro Woche, jeweils 30 (DUhLB) bzw. 15 (DUK) Minuten) unterzogen (Laufband, _LB). Zur Kontrolle wurden jeweils acht Tiere beider Gruppen nicht trainiert (ohne Belastung, _oB). Von Mäusen aus diesen vier Experimentiergruppen (DUhLB_oB, DUhLB_LB, DUK_oB, DUK_LB) wurden Proben der Hypophyse entnommen (acht Mäuse je Gruppe, n=32).
5. Die Proben der Hypophyse wurden für eine RNA-Sequenzierung mittels *next generation sequencing* (NGS) verwendet. Um differentiell exprimierte Gene (DEGs) zu untersuchen, wurden auf Basis der vier Experimentiergruppen vier paarweise Vergleiche berechnet. Dabei wurden die Transkriptomdaten von DUhLB- und Kontrollmäusen ohne Belastung (DUhLB vs DUK_oB) und mit Belastung auf dem Laufband (DUhLB vs DUK_LB) miteinander verglichen sowie die Transkriptomdaten von DUhLB-Mäusen mit und ohne Belastung (DUhLB_LB vs oB) und Kontrollen mit und ohne Belastung (DUK_LB vs oB) verglichen. Als differentiell exprimiert galten Gene mit einer FDR (*false discovery rate*) $<0,05$.

6. Die RNAseq-Expressionsdaten wurden mittels quantitativer Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) technisch validiert. Eine anschließende bioinformatische Analyse mittels der Software Ingenuity Pathway Analysis® (IPA®) diente dazu, die transkriptionellen Expressionsunterschiede in Geninteraktionsnetzwerken zu visualisieren und funktionell zu interpretieren. Der Fokus der Analyse mittels IPA® lag auf dem Vergleich untrainierter DUhLB- und Kontrollmäuse (DUhLB vs DUK_oB), die Genexpressionsunterschiede in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung zeigten, und trainierter und untrainierter Kontrollmäuse (DUK_LB vs oB), die Genexpressionsunterschiede in Assoziation zum Training zeigten.
7. Mittels RNAseq konnte insgesamt die Expression von über 17.000 verschiedenen Gentranskripten in der Hypophyse der Mäuse gemessen werden. In Assoziation zu hoher Ausdauerleistung (DUhLB vs DUK_oB) konnten 1732 DEGs und damit etwa dreimal so viele wie in Assoziation zum Training (DUK_LB vs oB, 637 DEGs) quantifiziert werden.
8. Um herauszufinden, welche Gene sowohl in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung als auch in Assoziation zu Training differentiell exprimiert waren, wurde die Schnittmenge der Genlisten der Vergleiche DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB untersucht. 120 Gene waren sowohl im Zusammenhang mit hoher Ausdauerleistung als auch im Zusammenhang mit dem Training differentiell exprimiert. Diese DEGs machten nur einen kleinen Anteil (etwa 7%) aller DEGs in untrainierten DUhLB-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen aus.
9. Funktionell betrafen die Genexpressionsunterschiede in den beiden Vergleichen DUhLB vs DUK_oB und DUK_LB vs oB bspw. *solute carrier* Transporter, Wachstumsfaktoren, den Östrogenrezeptor ESR1 und assoziierte Transkripte wie den Hypophysen-spezifischen positiven Transkriptionsfaktor 1 (POU1F1) oder den Leptinrezeptor.
10. Die Untersuchung der Expressionslevel von Wachstumsfaktoren deutete auf ein vermindertes Zellwachstum in der Hypophyse in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung und Training hin. Die differentielle Expression verschiedener Transporter implizierte einen erhöhten Glukosebedarf bei vermindertem Fettsäuremetabolismus in der Hypophyse von untrainierten DUhLB-Mäusen relativ zu untrainierten DUK-Mäusen. Außerdem implizierte die Zusammenschau der Ergebnisse keine Hochregulation der GH-Hypophysenachse in Assoziation zu hoher Ausdauerleistung oder Training. Eine differentielle Expression von Genen der ACTH- und OXT-Achse ließ sich aus den RNAseq-Daten der untrainierten DUhLB- und trainierten DUK-Mäuse relativ zu untrainierten DUK-Mäusen auch nicht ableiten.
11. Die Analyse des gesamten Transkriptoms der Hypophyse in Assoziation zu einem Ausdauertraining stellt einen neuen Untersuchungsansatz dar. Die Daten zum Einfluss der Hypophyse am Stoffwechsel unter körperlicher Aktivität müssen weiter vervollständigt werden und es sollte nach Biomarkern gesucht werden, die einen Zusammenhang zwischen Sport und Regulation der Hypophysenachsen herstellen, um letztendlich daraus mögliche diagnostische und therapeutische Ziele für die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen abzuleiten.

12. Für weitergehende Experimente wäre es sinnvoll, Serumspiegel der Hypophysenhormone für die untersuchten Mäuse zu bestimmen. Des Weiteren ist es empfehlenswert, eine Analyse der DEGs auf Proteinebene, bspw. über *western blot*, durchzuführen. Die Kombination aus Transkriptom-, Protein- und Serumdaten eröffnet potentiell die Möglichkeit, die Regulation der Hypophysenachsen bei hoher Ausdauerleistung und Training besser abschätzen zu können.

8.10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen aus anderen Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes sowie die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher in dieser oder ähnlicher Form weder im Inland noch im Ausland an einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder einem ähnlichen Prüfungsverfahren eingereicht.

.....

Ort, Datum

.....

Caroline Charlotte Caffier

8.11 Danksagung

Hiermit möchte ich all denen danken, die zum Vollenden dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Klaus Zettl aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundliche und engagierte Betreuung meiner Promotionsarbeit sowie die von ihm eingebrachten Anregungen und Ratschläge.

Den Mitarbeitern des FBN Dummerstorf unter Vorstand Herrn Prof. Dr. Klaus Wimmers möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung meiner Promotionsarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt dabei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Signaltransduktion am FBN Dummerstorf unter Leitung von Herrn PD Dr. Andreas Höflich sowie auch Frau PD Dr. Siriluk Ponsuksili und ihrer Arbeitsgruppe Funktionelle Genomanalyse für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit sowie für viele wertvolle Diskussionen und Denkanregungen, die mir sowohl für die Durchführung als auch die Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit oft die entscheidenden Wegweiser waren.

Ich danke Herrn PD Dr. Andreas Höflich für die Ermöglichung der interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen der Universitätsmedizin Rostock und dem FBN Dummerstorf. Außerdem danke ich ihm für das Korrekturlesen der Dissertationsarbeit und die zahlreichen hilfreichen Anregungen und Denkanstöße in neue Diskussionsrichtungen.

Frau Dr. Julia Brenmoehl danke ich für die Planung und Durchführung des Tierexperimentes sowie die Überlassung der Daten zu den Tieren. Zudem möchte ich mich auch bei ihr für zahlreiche Anregungen und Ratschläge sowie Zuarbeiten und Korrekturen bedanken, welche die vorliegende Arbeit in den entscheidenden Phasen vorangetrieben haben.

Bei Frau Dr. Christina Walz bedanke ich mich für die Einarbeitung und Unterstützung im Umgang mit dem Programm IPA® sowie ihre zahlreichen Hilfestellungen und Zuarbeiten bei der funktionellen Analyse der NGS-Daten. Ich danke ihr außerdem insbesondere für die mentale Unterstützung und die Motivation zu Zeitpunkten, in denen die Arbeit stockte, sowie für das Vorantreiben der experimentellen und funktionellen Analysen, wenn ich in zeitlichen Verzug kam.

Ich danke Frau Dr. Daniela Ohde, mit deren Hilfe ich die experimentelle Validierung der NGS-Daten geplant und durchgeführt habe und die mir bei der statistischen Auswertung der Validierung der NGS-Daten geholfen hat.

Ebenso danke ich Frau Dr. Antonia Noce für zahlreiche anregende Diskussionen und Tipps, die sie mir während der Durchführung meiner experimentellen Arbeit in Dummerstorf gegeben hat.

Auch Frau Luong Chau und Frau Vanessa Caton möchte ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente zur Validierung der NGS-Daten danken.

Herrn Dr. Nares Trakooljul und Mitarbeitern danke ich für die Durchführung der Sequenzierung und freundliche Überlassung der NGS-Daten und die statistische Analyse auf DEGs (Gruppenvergleiche).

Herrn Dr. Michael Hecker danke ich für die zahlreichen Anregungen und Ratschläge in den Diskussionsrunden und beim Korrekturlesen, die oft den Blick auf die wichtigen Dinge fokussierten und somit die Disserationsarbeit grundlegend mit formten.

Ich danke meiner lieben Freundin Elli Brosig für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit, in der ich die vorliegende Dissertation angefertigt habe und in der sie mir immer mit Ratschlägen, Anregungen und freundschaftlichen Diensten zur Seite stand.

Zu guter letzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, und meinen Freunden, die sich immer wieder geduldig meine Sorgen und Ängste anhörten und Ratschläge erteilten sowie für ausreichend Ablenkung sorgten.