

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin  
Abteilung für molekulare und zelluläre Sportmedizin  
Deutsche Sporthochschule Köln  
Geschäftsführender Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Bloch

**Myozelluläre Stressantwort:  
Regulation von  $\alpha$ B-Crystallin infolge von akutem und chronischem krafttrainings-  
induziertem mechanischem Stress**

An der Deutschen Sporthochschule Köln  
zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Sportwissenschaft**

angenommene Dissertation

vorgelegt von

**Daniel Jacko**

aus

Oppeln (Polen)

Köln 2021

Erste/r Gutachter/in:	Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Bloch
Zweite/r Gutachter/in:	Univ.-Prof. Dr. Sebastian Gehlert
Vorsitzende/r des Promotionsausschusses:	Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Bloch
Datum der Disputation:	17.03.2021

Eidesstattliche Versicherungen gem. § 7 Abs. 2 Nr. 4 und 5 der Promotionsordnung der Deutschen Sporthochschule Köln, 20.02.2013:

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

Hierdurch erkläre ich, dass ich die „Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis“ der Deutschen Sporthochschule Köln eingehalten habe.

---

Datum, Unterschrift

## Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med Wilhelm Bloch einen ganz großen Dank aussprechen für das in mich gesetzte Vertrauen, die Projekte selbständig durchzuführen. Ich bedanke mich auch für die wissenschaftliche Inspiration und fachliche Hilfe, die er mir gab.

Ein besonderer Dank geht an Univ.-Prof. Dr. Sebastian Gehlert, der mich bereits seit dem Masterstudium und bis hin zu dem aktuellen Punkt eng betreut und sehr viel gelehrt hat. Er gab mir fortwährend jeden Freiraum, den ich wollte und jede Hilfe, die ich brauchte. Nicht zuletzt danke ich ihm dafür, dass er sich stets um meine Finanzierung kümmerte.

Auch danken möchte ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, allen voran Frau Anika Voss, Frau Bianca Collins, Frau Mojgan Ghilav, Herrn Thomas Dietz und Frau Gundula Mades, für ihre Unterstützung sowie dafür, dass sie den täglichen Laborbetrieb und Verwaltungsapparat am Laufen halten.

Ferner möchte ich mich bei allen Probanden sowie studentischen Hilfskräften, und darunter vor allem Frau Käthe Bersiner, bedanken, die bei der Umsetzung der Studien, der Analytik und Auswertung mitgewirkt haben.

Einen großen Dank möchte ich zudem Herrn PD Dr. Dr. Thorsten Schiffer mit samt Praxis-Team, allen voran Frau Waltraud Krüger, sowie Herrn Dr. Markus De Marées, für die Durchführung der unzähligen Muskelbiopsien im Rahmen der Studien, aussprechen.

Meinen außerordentlichen Dank möchte ich meinem Kollegen und Freund Dr. Oliver Heine bekunden, der mich sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene durch seine ganz eigene, besondere Art, stark geprägt hat.

In diesem Zuge möchte ich mich auch beim OSP NRW/Rheinland bedanken, der mir durch tolle Kollegen und ein super Arbeitsklima einen problemlosen Abschluss dieser Arbeit ermöglicht hat.

Mein Herzensdank gilt meiner Familie und allen voran meiner geliebten Mutter und Schwester die bedingungslos für mich da sind und mich auf meinem privaten und beruflichen Werdegang begleiten.

In diesem Sinne möchte ich mich auch bei meiner Frau bedanken, für ihr Verständnis, ihre Rücksicht und Geduld, die sie mir im Zuge der Vollendung dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Gewidmet ist diese Arbeit denen, die von uns gegangen sind  
sowie denen,  
die vor kurzem zu uns kamen.

# Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	1
II	Abbildungsverzeichnis	1
III	Zusammenfassung	3
IV	Summary	5
1.	Einleitung	7
2.	Theoretischer Hintergrund	10
2.1	Stress im physiologischen Sinn- Begriffsbestimmung	10
2.2	Belastungsinduzierter Zellstress	11
2.2.1	Metabolischer Stress	12
2.2.2	Mechanischer Stress	12
2.2.3	Fasertypspezifische Betrachtung kontraktionsinduzierten Stresses	13
2.3	$\alpha$ B-Crystallin	14
2.3.1	Phosphorylierung von $\alpha$ B-Crystallin an Serin 59	15
2.3.2	Regulation von $\alpha$ B-Crystallin im Skelettmuskel infolge von kontraktionsinduziertem Stress	16
2.4	Die Rolle von Desmin im Skelettmuskel	18
2.4.1	Die Regulation von Desmin im Skelettmuskel infolge von Kontraktionsinduziertem Stress	19
3.	Fragestellungen	20
4.	Methoden und Ergebnisse	22
4.1	Kurzzusammenfassungen der Publikationen	23
5.	Diskussion	25
5.1	Ergebnisdiskussion: Effekte akuter Belastung auf die $\alpha$ B-Crystallin Regulation	25
5.2	Ergebnisdiskussion: Effekte chronischer Belastung auf die $\alpha$ B-Crystallin Regulation	31
5.3	Methodendiskussion	39
5.3.1	Studiendesign	38
5.3.2	Analytik	39
6.	Zusammenfassung der Befunde und Schlussfolgerungen	42
7.	Ausblick	43
8.	Literaturverzeichnis	45
V	Anhang	57
V.i	Originalpublikationen	
V.ii	Lebenslauf	

## I Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALS	Amylotrophe Lateralsklerose
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CASA	chaperone-assisted selective autophagy/ Chaperon-assistierte selektive Autophagie
CRYAB	alpha ( $\alpha$ ) B-Crystallin/ alias HSPB5
d.h.	das heißt
EDL	extensor digitorum longus
et al.	et al. / und andere
etc.	et cetera
EXZ	Exzentrische Gruppe
H <sup>+</sup>	Proton/ Wasserstoffkation
HSP	heat shock protein/ Hitzeschockprotein
HSP60, 70, 90	heat shock protein/ Hitzeschockprotein 60, 70, 90
HSPB1	heat shock protein B1/ Hitzeschockprotein B1/alias HSP27
HSPB5	heat shock protein B5, alias alpha B-crystallin/ Hitzeschockprotein B5
HYP	Hypertrophie-orientierte Gruppe
IHC	Immunhistochemie
JNK	c-Jun NH2 terminale Kinase
KA	Kraftausdauer-orientierte Gruppe
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KON	konstant trainierende Gruppe
MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MAX	Maximalkraft-orientierte Gruppe
MHC	myosin heavy chain / Myosin schwere Kette
min	Minuten
mTOR	mammalian target of rapamycin
NI	Niedrigintensiv-orientierte Gruppe
o.g.	oben genannt

p38	Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
pCRYAB <sup>S59</sup>	Phosphorylierung von alpha B-Crystallin an Serin 59
pH	pondus Hydrogenii
pJNK <sup>T183/Y185</sup>	Phosphorylierung der c-Jun NH2 terminalen Kinase an Threonin 183 und Tyrosin 185
pp38 <sup>T180/Y182</sup>	Phosphorylierung Mitogen-aktivierter Proteinkinase p38 an Threonin 180 Tyrosin 182
PROG	Progressiv trainierende Gruppe
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationsassay-Puffer
s.	siehe
s.g.	so genannt
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sHSP	small heat shock protein / kleines Hitzeschockprotein
TBS	Tris buffered saline
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WM	Wiederholungsmaximum

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Veranschaulichung der Funktion von CRYAB infolge von Zellstress.

Abbildung 2 Veranschaulichung des 1. Versuchsaufbaus bzgl. Assoziation von CRYAB mit dem Zytoskelett.

Abbildung 3 Veranschaulichung des 2. Versuchsaufbaus bzgl. Assoziation von CRYAB mit dem Zytoskelett.

## II Zusammenfassung

Die Fähigkeit der Skelettmuskulatur, dem durch kontraktile Aktivität generierten Stress zu widerstehen, ist grundlegend für die Erhaltung ihrer Funktionsfähigkeit während der gesamten Lebensspanne. Im Laufe des Evolutionsprozesses haben Myozyten zu diesem Zweck diverse Strategien entwickelt. Infolge eines Stressereignisses wird in erster Instanz über die akute Stressantwort die Homöostase und folglich die Funktionsfähigkeit der Zellen gesichert, wobei wiederholte Stressereignisse zu einer persistenten Erweiterung der Kompensationskapazitäten bzw. zu einer Anpassung führen. Die spezifische Art der Anpassung hängt in direkter Weise mit der Ausprägung des induzierten Stresses zusammen. Dieser als solcher wiederum ist im physiologischen Sinne ausschließlich über die Spezifik der Stressantwort identifizierbar. Damit ist ein hinreichendes Verständnis zielgerichteter muskulärer Anpassung untrennbar mit einem umfassenden Verständnis der Regulation der molekularen Stressantwort verbunden.

Ein Hauptakteur des myozellulären Sofortschutzmechanismus ist  $\alpha$ B-Crystallin (CRYAB), ein zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine gehörendes ATP-unabhängiges Chaperon. Als solches besitzt das Protein eine zytoprotektive Funktion, indem es sich entfaltende bzw. fehlgefaltete Proteine „einfängt“, so deren irreversible Aggregation verhindert und sie in Kooperation mit weiteren, ATP-abhängigen Chaperonen ihrer Renaturierung oder aber dem autophagosomalen Abbau zuführt. Aus dem Skelettmuskel ist bekannt, dass CRYAB infolge von kontraktionsinduziertem Stress aus dem Zytosol hin zu zytoskelettalen Strukturen transloziert und mit diesen assoziiert, wodurch eine Stabilisierung und somit ein Schutz vor potenzieller (weiterer) Schädigung einhergeht. Dabei scheint im humanen Skelettmuskel vor allem die mechanische Stresskomponente für die Induzierung von CRYAB infolge kontraktiler Aktivität ausschlaggebend zu sein. Ein wesentlicher Faktor für die Funktion und damit die zytoprotektiven Eigenschaften von CRYAB ist seine Phosphorylierung an Serin 59.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein umfassendes Verständnis über die Regulation von CRYAB infolge von krafttrainingsinduziertem mechanischen Stress zu generieren. Aufgrund der Heterogenität des Skelettmuskelgewebes hinsichtlich seiner Fasertypen (Typ I, IIA, IIX) und damit einhergehenden funktionellen Eigenschaften, war es ferner das Ziel, ein fasertypspezifisches Abbild der CRYAB-Regulation zu erzeugen. Die Untersuchung der Regulation umfasste die Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 ( $p$ CRYAB<sup>S59</sup>), die Expression des totalen CRYAB, sowie seine Translokation bzw. Assoziation mit Strukturen des Zytoskeletts.

Hierfür wurde in einer ersten Studie die Regulation von CRYAB unter dem Einfluss verschiedener Belastungsarten und damit unterschiedlich hohem kontraktionsinduzierten mechanischen Stress sowie verschiedener Belastungsvolumina untersucht (73). Im Fokus stand dabei die Akutantwort von CRYAB infolge von singulärem, sich nicht wiederholendem Stress. Anknüpfend an die dadurch gewonnenen Erkenntnisse wurde nachfolgend der Einfluss von chronischer Belastung auf die akute

CRYAB-Regulation behandelt. Es wurde untersucht, ob die akute myozelluläre Stressantwort infolge von systematisch wiederholter Belastung sowie einer temporären Aussetzung derselben modifiziert wird. Ausgehend von der Annahme, dass eine systematisch wiederholte Stressexposition zu einer Anpassung im Sinne einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Stressor führt, galt das Interesse möglichen Faktoren, die zu dieser potenziellen myozellulären mechanischen Stressresistenz beitragen könnten. Hierzu wurde ermittelt, ob das Typ III Intermediärfilament Desmin, ein wichtiges Strukturprotein, das u.a. an der lateralen Kraftübertragung beteiligt ist, im Zuge wiederholter Krafttrainingsreize eine Hochregulierung erfährt.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass krafttrainingsassoziierte Belastung zu einem starken Anstieg der  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> führt, wofür die mechanische Stresskomponente wesentlich ist. Bei systematischer Wiederholung der Belastung kommt es zu einer sukzessiven Abschwächung der  $p$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort und Zunahme der Desminmenge; wird jedoch die regelmäßige Belastungsexposition des Muskels für eine gewisse Zeit ausgesetzt, nimmt die Desminmenge wieder ab- und die  $p$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort zu, infolge erneuter Belastung. Somit stellt es sich dar, als würde das  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> Signal der Desminmenge in einer Art inverser Beziehung folgen. Dabei scheint vor allem hoher mechanischer Stress die Desminzunahme zu fördern. Die  $p$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort sowie die Translokation von CRYAB sind fasertypspezifisch und abhängig von der Art der Belastung. Konkreter bedeutet dies, dass während die  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> in Typ I Fasern infolge von Belastungen sowohl gegen relativ niedrige als auch gegen hohe äußere Widerstände ansteigt, ein Anstieg in Typ II Fasern lediglich durch hohen Widerstände zu beobachten ist. Grundsätzlich wird CRYAB infolge der Akkumulation eines gewissen Belastungsvolumens (multipler Sätze) phosphoryliert (73). Dabei kann ein erhöhtes Belastungsvolumen die Phosphorylierung von CRYAB in Typ II Fasern begünstigen, auch wenn die reine Intensität (Höhe des äußeren Widerstandes) *per se*, relativ niedrig ist.

Daraus folgern wir, dass die akute myozelluläre Stressabwehrreaktion in Form der Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59, in geeigneter Weise den Einfluss von kontraktionsinduziertem mechanischen Stress, auf Einzelfaserebene anzeigt. Des Weiteren reflektiert CRYAB dabei die Desensibilisierung der Myozyten gegenüber wiederholtem mechanischen Stress, sowie ihre Resensibilisierung im Zuge des Ausbleibens regelmäßiger Stimulation. Ein dynamischer Prozess des Auf- und Abbaus des zytoskelettalen Desminnetzwerkes dient dabei der Anpassung an diese sich ändernden Anforderungen myozellulärer Resistenz gegenüber mechanischem Stress. Diese Erkenntnisse dienen zum einen dem Verständnis der Funktion des Proteins im Rahmen der Stressabwehrreaktion unter praxisrelevanten *in vivo* Bedingungen. Zum anderen helfen sie dabei, die Effekte diverser akuter Belastungen sowie chronischer Be- und Entlastungsphasen hinsichtlich ihrer fasertypspezifischen sowie zeitlichen Ausprägung besser zu verstehen.



### III Summary

The ability of skeletal muscle to withstand the stress generated by contractile activity is fundamental to maintaining its functional capacity throughout the life span. During the evolutionary process, various strategies developed in myocytes for this purpose. Resulting from a stress event, in the first instance, the acute stress response ensures the homeostasis and consequently the functionality of the cells. Repeated stress events lead to a persistent expansion of the compensation capacities or to adaptation. The specific type of adaptation is directly related to the characteristic of the induced stress. This stress, in turn, is in the physiological sense only identifiable by the specificity of the stress response. Thus, a sufficient understanding of targeted muscular adaptation is inseparably linked to a comprehensive understanding of the regulation of the molecular stress response.

A key player in the myocellular immediate protection mechanism is  $\alpha$ B-Crystallin (CRYAB), an ATP-independent chaperone belonging to the family of small heat shock proteins. As such, the protein has a cytoprotective function by "capturing" unfolding or misfolded proteins, therefore preventing their irreversible aggregation and, in cooperation with other ATP-dependent chaperones, leading them to renaturation or autophagosomal degradation. It is known from skeletal muscle that CRYAB translocates from the cytosol to cytoskeletal structures and associates with these as a result of contraction-induced stress, thereby stabilizing and protecting against potential (further) damage. In the human skeletal muscle, the mechanical stress component seems to be the most important factor for the induction of CRYAB due to contractile activity. An essential factor for the function and thus the cytoprotective properties of CRYAB is its phosphorylation on serine 59.

The aim of the present work was to generate a comprehensive understanding of the regulation of CRYAB in response to resistance exercise-induced mechanical stress. Due to the heterogeneity of skeletal muscle tissue with respect to its fiber types (type I, IIA, IIX) and the resulting functional properties, it was also intended to generate a fiber type-specific image of CRYAB-regulation. The investigation of the regulation included the phosphorylation of CRYAB at serine 59 ( $p$ CRYAB<sup>S59</sup>), the expression of total CRYAB and its translocation or association with cytoskeletal structures.

Therefore, in a first study, the regulation of CRYAB was investigated under the influence of different loading types and thus different levels of contraction-induced mechanical stress, as well as different stress volumes(73). The focus was on the acute response of CRYAB following single, non-repetitive stress. Based on these findings, the influence of chronic stress on acute CRYAB-regulation was examined. It was investigated whether the acute myocellular stress response is modified as a result of systematic repetitive stress as well as of a temporary termination of this stress. Assuming that systematically repeated stress exposure leads to an adaptation in the sense of an increased resistance to the stressor, the interest was focused on possible factors that could contribute to this potential myocellular mechanical stress resistance. For this purpose, it was determined whether the type III

intermediary filament desmin, which is an important structural protein involved in lateral force transmission, is upregulated in the course of repeated resistance exercise stimuli.

In summary, we could show that resistance exercise-associated stress leads to a strong increase in  $p\text{CRYAB}^{559}$ , for which the mechanical stress component is essential. Systematic repetition of exercise leads to a successive attenuation of the  $p\text{CRYAB}^{559}$ -response and increases the amount of desmin; however, if regular stress exposure of the muscle is terminated for a certain period of time, the amount of desmin decreases and the  $p\text{CRYAB}^{559}$ -response increases again as a result of renewed exercise. Thus, the  $p\text{CRYAB}^{559}$ -signal appears to follow the amount of desmin in a kind of inverse relationship. In the course of this, it seems that high mechanical stress in particular promotes the increase in desmin. Furthermore, the  $p\text{CRYAB}^{559}$  response and the translocation of CRYAB are fiber type-specific and depend on the type of loading applied. In detail, while  $p\text{CRYAB}^{559}$  increases in Type I fibers as a result of loadings with low as well as with high external resistances, an increase in Type II fibers can only be observed as a result of loadings with high external resistances. In general, CRYAB is phosphorylated due to the accumulation of a certain load volume (multiple sets). Moreover, an increased loading volume can promote the phosphorylation of CRYAB in type II fibers, even if the pure intensity (level of external resistance) per se is relatively low.

We conclude that the acute myocellular stress defense response in the form of phosphorylation of CRYAB at serine 59 appropriately indicates the influence of contraction-induced mechanical stress at the single-fiber level. Furthermore, CRYAB reflects the desensitization of myocytes to repeated mechanical stress as well as their resensitization in the absence of regular stimulation. A dynamic process of building and breaking down the cytoskeletal desmin network is used to adapt to the changing requirements of myocellular resistance to mechanical stress. On the one hand, these findings serve to understand the function of CRYAB in the context of the stress defense reaction under practically relevant in vivo conditions. On the other hand, they can help to differentiate between more and less effective types of exercise for the induction of acute stress as well as chronic adaptation of muscle fibers. In the context of applied exercise science, the knowledge of cause-effect relationships (load-adaptation) is thus expanded, which makes it possible to control training more precisely on the basis of physiological observations over time.

# 1 Einleitung

Die Interaktion eines jeden Organismus mit seiner Umwelt bedingt dessen fortwährende Exposition gegenüber diversen Reizen (19). Auf der einen Seite stehen dabei Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, Temperaturschwankungen, Radioaktivität und die Schwerkraft; auf der anderen Seite führt das Agieren des Organismus in seiner Umwelt selbst zur Generierung einer enormen Reizvielfalt, die assoziiert ist mit Schwankungen des pH-Wertes, Ionenverschiebungen, der Produktion freier Radikale und vor allem der Erzeugung mechanischer Kraft (5, 25, 41, 69, 129, 134, 143) – um nur einige wesentliche zu nennen. Jeder Reiz für sich genommen sowie in Kombination auftretend besitzt das Vermögen, die Homöostase und Integrität einzelner zellulärer Subsysteme in empfindlicher Weise zu stören (5). So kann mechanische (46, 135) und somit auch die durch Muskelkontraktion induzierte und auf Strukturen des Zytoskeletts einwirkende Spannung (25, 55) genauso zu einer Entfaltung/Denaturierung bzw. Schädigung von Proteinen führen (20, 53, 83, 96), wie dies bspw. eine externe Erhöhung der Temperatur tun kann (88). Ein zunehmend entfaltetes Proteom führt dabei zum Funktionsverlust sowie zur Aggregation geschädigter Proteine, was in Störungen des jeweiligen Systems resultieren und bis hin zum Untergang des Gesamtorganismus reichen kann (54).

1962 untersuchte der italienische Forscher Ferruccio Ritossa (133) die Synthese von Nukleinsäuren anhand von Speicheldrüsen der *Drosophila*. Als Reaktion der Zellen auf eine erhöhte Temperatur beobachtete er erstmalig einen starken Anstieg der Transkriptions- und Syntheserate einiger bis dahin noch unbekannter Proteine. Erst gut 12 Jahre später wurden diese als „heat shock proteins“ (HSPs) identifiziert und es wurde festgestellt, dass sie in nahezu allen Gewebearten vorzufinden sind, von Nerven- bis hin zu Muskelzellen aller Art (106, 152). Dass Ritossas Beobachtung ein auf einen zu hoch eingestellten Inkubator zurückzuführender Zufallsfund war -- und dass sein erstes Manuskript zu dem Thema prompt wegen vermeidlich mangelnder biologischer Bedeutung abgelehnt wurde, ändert nichts an der Tatsache, dass er damit den Grundstein zur Erforschung eines der wichtigsten und konserviertesten Stressabwehrsysteme im Organismus, von Bakterien bis hin zum Menschen, gelegt hatte (106).

Heute weiß man, dass der anfangs nur als s.g. „*heat shock response*“ bezeichnete Mechanismus keineswegs rein temperaturabhängig ist, sondern eine Universalantwort von Zellen darstellt, ihre Proteostase aufrecht zu erhalten oder wiederherzustellen (1, 119) - kurzum, um ihr Überleben unter Stressbedingungen diverser Art zu sichern (15). Das spezifisch erhöhte Auftreten von HSPs bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und ALS (amyotrophe Lateralsklerose) (24, 68), aber auch bei akuten Läsionen wie Herz- und Hirninfarkt sowie auch Querschnittslähmung (8, 36, 81), verdeutlicht die hohe Bedeutung der Proteinfamilie bei zahlreichen Prozessen der Pathogenese sowie der Rekonvaleszenz.

Die gezielte Anpassung von Organsystemen durch körperliche Belastung bzw. sportliches Training ist von höchster Bedeutung nicht nur im Kontext leistungssportlichen Rekordstrebens. Längst ist klar, dass ein adäquates Maß an körperlicher Belastung ein unabdingbarer Faktor zur Gesunderhaltung des Organismus ist und somit mittlerweile auch ein fester Bestandteil einer nahezu jeden rehabilitativen Maßnahme (163).

Gleichzeitig ist aber jedwede Art der Anpassung eines Organismus, sei es an seine Umwelt oder aber an interne Reize, an die Präsenz oder aber Abwesenheit eines bestimmten Stressors bzw. an eine Kombination von Stressoren gebunden (19). Dabei kann die Anpassung als das Bestreben der betroffenen Zellen verstanden werden, ihre Homöostase und Integrität aufrecht zu erhalten, wiederherzustellen oder vor wiederholten homöostatischen Störungen zu schützen. Damit ist ein hinreichendes Verständnis zielgerichteter körperlicher Anpassung untrennbar mit einem umfassenden Verständnis der Regulation der molekularen Schutzmechanismen des entsprechenden Organsystems verbunden. Umgekehrt: wenn das Ziel die Untersuchung molekularer Mechanismen in komplexen Organismen wie dem des Menschen ist, so ist die kontrollierte körperliche Belastung die einzige nicht-pharmakologische Möglichkeit, die Homöostase ausgesuchter Organsysteme gezielt zu verändern bzw. in definierter Weise zu stören und die molekulare Signatur der Stressantwort zu analysieren.

Dabei erlaubt es der Skelettmuskel, wie kein anderes Gewebe, durch seine willentliche Ansteuerung Stressreize gezielt zu setzen. Durch die Variation diverser Belastungsparameter wie der Kontraktionsart (isometrisch/konzentrisch/exzentrisch) und -geschwindigkeit, der Höhe des äußeren Widerstandes sowie der willentlich erzeugten Kraft gegen diesen, des Belastungsvolumens sowie der Belastungsfrequenz (akut/chronisch) etc., können variable Reize erzeugt werden, die sich in einem Kontinuum zwischen Ausdauer- (metabolischem) und Kraft-assoziiertem (mechanischem) Stress bewegen. Auch wenn in komplexen Organismen die genannten Stressoren nicht gänzlich isoliert zu betrachten sind (zumindest *in vivo*), so kann ein bestimmter Bereich des o.g. „Stress-Arten-Kontinuums“ durch eine entsprechende Konstellation der Belastungsparameter deutlich forciert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eben dieses Potential definierter Belastung des Skelettmuskels genutzt, um die Regulation von  $\alpha$ B-Crystallin (CRYAB), einem der Hauptakteure der zellulären Stressantwort, zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf der Regulation von CRYAB infolge von mechanischem Stress, der durch standardisierte Krafttrainingsbelastung induziert wurde. Die Untersuchung der Regulation umfasste die Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 ( $p$ CRYAB<sup>S59</sup>), die Expression des totalen CRYAB, sowie seine Translokation bzw. Assoziation mit Strukturen des Zytoskeletts.

Der humane Skelettmuskel ist ein myozellulär heterogenes Gewebe, das analytisch primär anhand der Expression unterschiedlicher Isoformen der Myosin schweren Kette in Typ I und Typ II (Typ II weiter in IIA und IIX) Fasern differenziert werden kann (141). Des Weiteren unterscheiden sich die Fasertypen bspw. hinsichtlich ihrer Morphologie und zytoskelettaler Architektur, bioenergetischer Faktoren und kontraktile Eigenschaften (23, 131, 141). Diese Differenzen wiederum bedingen, dass eine gegebene Belastung zu potenziell unterschiedlicher Stresserfahrung und damit auch -antwort in den verschiedenen Fasertypen führen kann, weshalb zusätzlich eine fasertypdifferenzierte Betrachtung der o.g. Parameter erfolgte.

In einer ersten Untersuchung war es das Ziel, die Regulation von CRYAB unter dem Einfluss verschiedener Belastungsarten und damit unterschiedlich hohem kontraktionsinduzierten mechanischen Stress, sowie verschiedener Belastungsvolumina zu untersuchen (73). Im Fokus stand dabei die Akutantwort von CRYAB infolge singulären, sich nicht wiederholenden Stresses.

Anknüpfend an die dadurch gewonnenen Erkenntnisse wurde nachfolgend in einer zweiten Studie mittels CRYAB-Regulation untersucht, ob, respektive wie, die akute myozelluläre Stressantwort infolge von systematisch wiederholter bzw. chronischer Belastung sowie einer temporären Aussetzung derselben modifiziert wird. Ausgehend von der Annahme, dass eine systematisch wiederholte Stressexposition zu einer Anpassung führt, galt das Interesse möglichen Faktoren, die zu einer erhöhten Resistenz der Myozyten<sup>1</sup> gegenüber mechanischem Stress beitragen könnten. Das Typ III Intermediärfilament Desmin bildet einen wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts. Es setzt u.a. an den Z-Scheiben an, verbindet benachbarte Sarkomere untereinander sowie diese mit dem Sarkolemm und ist dadurch essenziell für die laterale Kraftübertragung, Struktur und mechanische Stabilität von Myozyten (84, 94, 109, 123). Daher wurde korrespondierend mit der CRYAB-Regulation untersucht, ob wiederholte Krafttrainingsreize sowie deren Aussetzen zu einer veränderten Desmin-Expression führen.

---

<sup>1</sup> In adultem Skelettmuskelgewebe sind einzelne Myoblasten zu multinukleären Fasern verschmolzen und bilden ein s.g. Syncytium (167). Strenggenommen ist es daher in Zusammenhang mit adultem Skelettmuskelgewebe nicht korrekt von Zellen bzw. Myozyten zu sprechen. Verwendet wird diese Terminologie in vorliegender Arbeit jedoch aus Gründen der Vereinfachung.

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Stress im physiologischen Sinn/ Begriffsbestimmung

Stress – oder auch Spannung – besitzt im ursprünglichen Sinne der Physik eine klare Definition als das Maß für die mechanische Beanspruchung im Material und ist mathematisch darstellbar als die einwirkende Kraft pro Flächeneinheit. Demnach führt Stress zur Verformung von Körpern und zum Versagen von Materialien, wenn die Höhe des wirkenden Stresses die gegebene Materialfestigkeit übersteigt (25, 139).

Seitdem jedoch der Begriff *Stress* Ende der 1920 Jahre vom ungarisch-kanadischen Mediziner Hans Selye aus der Physik entliehen und auf physiologische Zusammenhänge übertragen wurde (106), hat er für diesen Kontext seine klare physikalische Dimension verloren und gilt als Universalbezeichnung für Zustände, die sich außerhalb der physischen (und psychischen) Norm befinden (19). In diesem Sinne wird der Stressbegriff auch nachfolgend in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die o.g. Norm bzw. Homöostase, *steady state*, oder auch Gleichgewicht, meint einen Zustand, den eine jede Zelle bestrebt ist zu erhalten oder wiederherzustellen und ist Voraussetzung für ihre adäquate Funktion mit dem übergeordneten Ziel: Erhaltung des Gesamtorganismus (19, 31). Einflüsse bzw. Reize, die zu einer Störung der Homöostase führen, werden als Stressoren bezeichnet (19, 31). Die Akutreaktion von Zellen und komplexen Organismen auf einen Stressor ist die Stressantwort, die auf eine zunächst kurzfristige Stabilisierung und Wiederherstellung der Homöostase zwecks Aufrechterhaltung notwendiger Funktionen abzielt (19, 31). Die Reaktion auf wiederkehrenden bzw. chronischen Stress umfasst die Steigerung der Kapazität und Leistungsfähigkeit von Kompensationsmechanismen der betroffenen Systeme, wodurch eine Stressresistenz erreicht wird, bzw. wiederholte gleichartige Reize ihr „Stresspotential“ verlieren und die Homöostase erhalten bleibt (19, 31). Stress im Allgemeinen gefährdet somit auf der einen Seite die Zellintegrität und -vitalität, stellt aber auf der anderen Seite gleichzeitig eine wichtige Signalfunktion zur Auslösung von Anpassungsmechanismen dar, die zur Steigerung der Resistenz gegenüber ebendiesen Stressoren führen. Folglich sichert Stress, konkreter aber die Stressantwort als Ausdruck der Fähigkeit des Organismus, auf potenziell schädliche Reize zu reagieren und sich diesen gegenüber anzupassen, das Überleben des Organismus in einer Umwelt, die geprägt ist von häufig wechselnden Bedingungen und Anforderungen.

## 2.2 Belastungsinduzierter Zellstress

Die willkürliche und feinst-abgestimmte Ansteuerung der Skelettmuskulatur ermöglicht es, mit der Umwelt zu interagieren, weshalb die Erhaltung einer für die Erfordernisse des Alltags hinreichenden Leistungsfähigkeit die Voraussetzung für die soziale Teilhabe während der gesamten Lebensspanne bildet. Gleichzeitig *generiert die Skelettmuskulatur ihre eigenen Stressoren*, welche sie – scheinbar paradoxerweise – zum einen schädigen und funktionell einschränken können, zum anderen aber unerlässliche Akteure bei ihrer Gesunderhaltung und Anpassung an veränderte Erfordernisse und Umweltbedingungen sind.

So ist es durch zielgerichtete körperliche Aktivität möglich, den menschlichen Organismus im Allgemeinen und die Muskulatur im Speziellen einer hohen Reizvielfalt auszusetzen und Stress derart dosiert zu erzeugen, dass die Stressantwort zu einem Ausbau oder aber zumindest zur Erhaltung des strukturellen und funktionalen Zustandes führt. Isolierte Zellen, zelluläre Substrukturen wie Myofibrillen, Sarkomere, oder gar einzelne Moleküle können sehr selektiv gewissen Reizen wie reaktiven Sauerstoffspezies (7), Temperaturschwankungen (90), Energierestriktion (75), pH-Änderungen (132) oder aber mechanischer Kraft (136) ausgesetzt werden, wodurch entsprechender Stress erzeugt werden kann. Wie einleitend bereits vorweggenommen wurde, verhält sich dies in komplexen Organsystemen jedoch anders. Kontraktile Aktivität der Skelettmuskulatur geht stets mit einem ganzen Ensemble oben genannter Reize einher (dabei handelt es sich lediglich um eine Auswahl der prominentesten). Dennoch erlauben es bestimmte, wohl gewählte Konstellationen der Belastungsparameter [vgl. (153)], Stressoren „semi-selektiv“ einzusetzen.

Weshalb „semi-selektiv“? Bei Stress, der durch kontraktile Aktivität induziert wird, kann von einem Kontinuum ausgegangen werden, innerhalb dessen die Höhe der muskulär zu erzeugenden Kraft der ausschlaggebende Faktor dafür ist, welcher Stressor forciert zum Tragen kommt und welche entsprechende Anpassung daraus resultiert (6, 26). Die zu generierende Kraft wiederum ist determiniert durch die zu lösende Aufgabe, die - stark vereinfacht - stets darin besteht, den eigenen Körper bzw. dessen Segmente gegen einen externen Widerstand der Höhe  $X$  in einer bestimmten Zeit von  $A$  nach  $B$  zu bewegen.

Daraus wird gefolgert: je höher der externe Widerstand und somit die von der Muskulatur zur Bewältigung einer spezifischen Aufgabe aufzubringende Kraft, desto größer der Anteil der mechanischen (vgl. Kap. 2.2.2) und desto geringer jener der metabolischen Komponente (vgl. Kap. 2.2.1) am potenziell resultierenden Stress und umgekehrt. Diese vereinfachte Darstellung berücksichtigt zwar nicht die unterschiedliche Ätiologie metabolischen Stresses (der zugrundeliegenden Stoffwechselwege), auch nicht die Arbeitsweisen der Muskulatur (konzentrisch, isometrisch, exzentrisch), soll aber verdeutlichen, dass die mechanische Komponente des kontraktionsinduzierten Stresses Hauptfaktor von krafttrainingsassoziierten Belastungen ist.

Dabei können Reize bzw. Stressoren, die auf die Muskulatur einwirken, grob in zwei Hauptkategorien unterteilt werden: den metabolischen und den mechanischen Stress. Beide werden in den nachfolgenden Unterkapiteln weiter ausgeführt, wobei der metabolische Stress lediglich kurz angerissen wird und der Fokus auf dem für die vorliegende Arbeit relevanten mechanischen Stress liegt.

### 2.2.1 Metabolischer Stress

Metabolischer Stress ist eine Sammelbezeichnung für eine Vielzahl von Einzelstressoren, die im Wesentlichen zurückzuführen sind auf die Prozesse der Energiebereitstellung, insbesondere infolge von kontraktile Muskelaktivität (69, 150). Die Hydrolyse von ATP und Kreatinphosphat und die Ansammlung von ADP sowie AMP, die Produktion von H<sup>+</sup>-Ionen und Anhäufung von freiem Phosphat, die vermehrte Generierung von freien Sauerstoffradikalen (oxidativer Stress) und die Steigerung der Laktatkonzentration (5, 129, 134, 143), um lediglich die prominentesten zu nennen, besitzen allesamt das Potential, im Falle unzureichender Kompensationsmechanismen (bspw. H<sup>+</sup>-Puffer- und antioxidative Systeme) die Homöostase zu stören bzw. Zellstress zu induzieren.

### 2.2.2 Mechanischer Stress

Die Kraft, die ein Muskel erzeugt, um bspw. äußere Widerstände zu überwinden, führt auch stets zu einer Spannung, die auf alle an der Erzeugung sowie Übertragung der Kraft beteiligten Strukturen wirkt (25, 55). Weiter deduziert bedeutet dies, dass auch jedes Protein und Molekül dieser Spannung ausgesetzt ist.

Proteine sind in ihrem Grundaufbau (Primärstruktur), lineare, aus einzelnen Aminosäuren über Peptidbindungen zusammengesetzte Polymere. Diese gehen aufgrund von intra- bzw. intermolekularen Kräften (u.a. durch Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte, Ionenbindungen, Disulfidbrücken) Bindungen ein und ordnen sich so zu hochspezifischen räumlichen Strukturen an (Sekundär-/Tertiärstruktur) bzw. assoziieren mit Proteinen gleicher sowie unterschiedlicher Art (Quartärstruktur) (4). Die korrekte Faltung (native Form) sowie Bindung mit anderen Proteinen bestimmt die adäquate Funktion des individuellen Proteins sowie der *Suprastruktur*, an der es beteiligt ist, wie eines Z-Streifens, des Sarkomers, der Myofibrille, usw. (4). Die durch mechanische Kraft erzeugte Spannung kann zu einer Trennung der o.g. intra-/intermolekularen Bindungen und somit einer partiellen- bis hin zu einer höhergradigen Entfaltung von Proteinen (46, 88) bzw. zu mechanisch induziertem Stress führen. Ent- bzw. fehlgefaltete Proteine stellen für Zellen ernste Probleme dar, weil sie zum einen ihre entsprechende Funktion verlieren und zum anderen zur Bildung von Aggregaten mit potenziell zytotoxischen Eigenschaften neigen (48). Die Tragweite, vor allem von Proteinaggregaten, wird u.a. anhand neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson deutlich. Diese



gehen mit einer Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein in Gehirnzellen einher, was zum Funktionsverlust und final zum Tod der Zellen führt (24).

Das prominenteste Beispiel für eine mechanisch induzierte höhergradige Entfaltung bzw. Proteinschädigung ist das s.g. *z-line streaming* in Sarkomeren. Dieses wird vor allem infolge von exzentrischen Muskelkontraktionen und damit einhergehend hoher Spannungsentwicklung in beteiligten Strukturen beobachtet (51, 52, 96). Neben solchen höhergradigen strukturellen Schädigungen, kann auch eine subtilere Proteinentfaltung die Folge von mechanischer Spannung sein, wie dies v.a. das Beispiel von Filamin (A, C) deutlich macht (76, 107, 155, 156). Das in der Z-Scheibe zur Verankerung von Aktinfilamenten dienende Homodimer wird infolge von kontraktionsinduzierter mechanischer Spannung partiell entfaltet, woraufhin eine Interaktionsdomäne exponiert wird. Chaperone, und allen voran HSPB1 (Hitzeschockprotein B1), können diese erkennen und über eine entsprechende Assoziation strukturstabilisierend/-schützend wirksam werden (34). Eine vergleichbare proteinstabilisierende Funktion wird auch für CRYAB infolge von Stress generell (57, 58, 63, 92), und insbesondere mechanischem Stress, berichtet (35, 83, 125, 126). Folglich spielt das Chaperonsystem im Allgemeinen, und das in der vorliegenden Arbeit thematisierte CRYAB im Speziellen, eine herausragende Rolle für die Erhaltung der Proteostase infolge von kontraktionsinduziertem mechanischem Stress.

### 2.2.3 Fasertypspezifische Betrachtung kontraktionsinduzierten Stresses

Die Skelettmuskulatur wird im Alltag und vor allem im Zuge sportassoziierter Tätigkeiten einer Vielzahl unterschiedlicher Anforderungen ausgesetzt. Derselbe Muskel, der uns zum einen dazu befähigt, sich mit einer gleichmäßigen, moderaten Geschwindigkeit über lange Strecken hinweg zu bewegen, besitzt gleichzeitig die Fähigkeit, im nächsten Moment seine Kraft um ein Vielfaches zu erhöhen und erlaubt es uns so, einen explosiven Sprint, Sprung oder Richtungswechsel wiederholt zu vollziehen. Ein Schlüsselement hierzu bildet die Heterogenität der Faserzusammensetzung (23). Der humane Skelettmuskel besitzt drei unterschiedliche Fasertypen (exklusive Hybriden), die dem aktuell üblichen Standard nach entsprechend ihrer Myosin schweren Ketten (MHC [*myosin heavy chain*]) Isoform voneinander abgegrenzt werden können: MHC- $\beta$  (Typ I), MHC-2A (Typ IIA) und MHC-IIX (Typ-IIX) (141). Diese Fasertypen unterscheiden sich hinsichtlich zahlreicher Faktoren, u.a. ihrer Rekrutierungsschwelle (2, 65, 103), ihrer maximal erzeugbaren Leistung (23, 151, 154), der Regulation der Proteinsynthese (60) und vor allem ihrer Zellarchitektur (64, 141). Es ist u.a. beschrieben, dass Typ II Fasern schmalere Z-Scheiben (52), kleinere Isoformen des sarkomerischen Myomesins (3), Obscurins und Nebulins sowie eine rigidere Form von Titin (130) im Vergleich zu Typ I Fasern haben (30). Folglich wird angenommen, dass bei Kontraktion in Typ II Fasern eine relativ höhere Spannung auf das Zytoskelett wirkt (30). Die strukturellen Unterschiede werden daher als Erklärungsansatz für die

Beobachtung herangezogen, dass Typ II Fasern vulnerabler für mechanisch induzierte Schädigung sind (30, 104, 105).

Folglich bestimmen Variablen wie Belastungsintensität und -volumen das spezifische Rekrutierungsmuster und somit auch die Exposition der unterschiedlichen Faserentitäten gegenüber dem kontraktionsinduzierten Stress. Daher ist für ein umfassendes Verständnis zur Auswirkung kontraktionsinduzierten Stresses auf den Skelettmuskel eine fasertypspezifische Betrachtung von großer Bedeutung.

### 2.3 $\alpha$ B-Crystallin

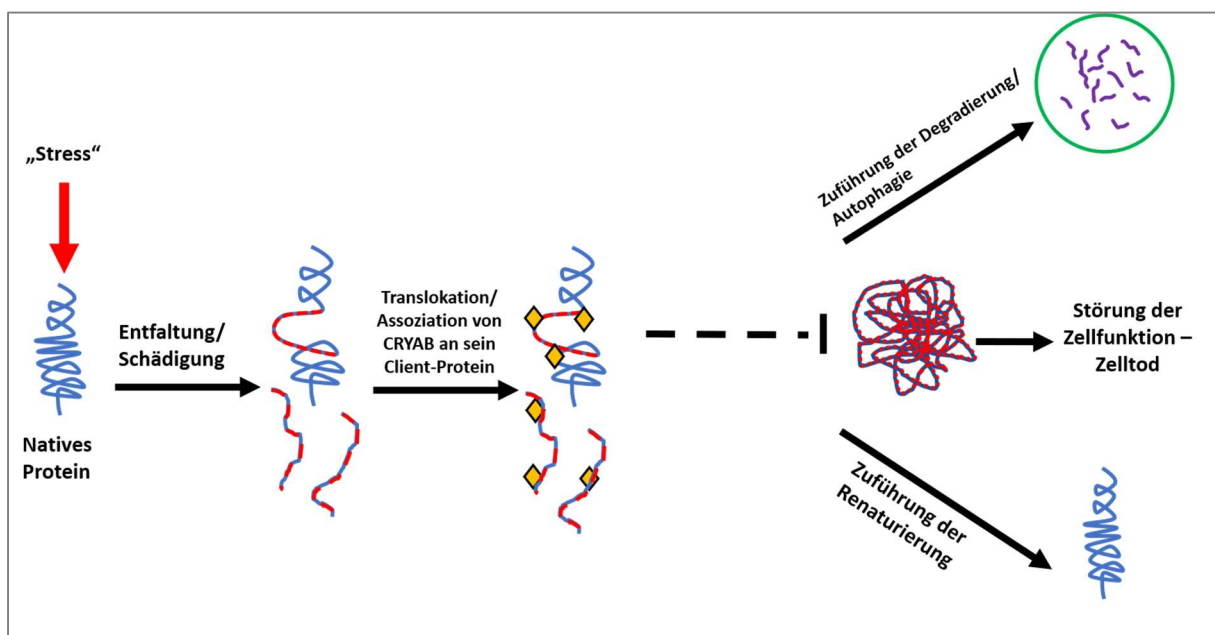
$\alpha$ B-Crystallin (CRYAB, heat shock protein B5 [HSPB5]) ist ein ATP-unabhängiges Chaperon aus der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (*small heat shock protein* [sHSP]) mit einer molekularen Masse von ~22 kDa (80). sHSPs zeichnen sich aus durch eine konservierte  $\alpha$ -Crystallin Domäne, individuelle sHSP-typische variable N- sowie C-terminale Sequenzen, sowie eine molekulare Masse zwischen ca. 13 und 43 kDa (27, 70, 116). CRYAB besitzt die Fähigkeit, sich entfaltende bzw. fehlgefaltete Proteine durch seine s.g. *holdase* -Aktivität 'einzufangen' und so deren irreversible Aggregation zu verhindern, wodurch dem Protein eine zytoprotektive Funktion zukommt (42). In Kooperation mit weiteren, ATP-abhängigen Chaperonen wie HSP60, HSP70, HSP90 können die ent-/fehlgefalteten Proteine in weiteren Schritten dann entweder ihrer Renaturierung oder aber dem autophagosomalen Abbau zugeführt werden (42, 100) (vgl. **Abbildung 1**). In ungestressten Zellen ist CRYAB primär im Zytosol lokalisiert (11) und liegt vor allem in großen Heterooligomeren vor, bestehend aus über 24 Untereinheiten (116).

Ursprünglich wurde CRYAB gemeinsam mit  $\alpha$ A-Crystallin als abundantestes Protein in der Augenlinse identifiziert, in der es im Wesentlichen an der Erhaltung ihrer Transparenz beteiligt ist (116). Inzwischen ist bekannt, dass CRYAB in zahlreichen weiteren Gewebearten exprimiert wird, u.a. in der Niere, der Lunge, der Haut, dem Gehirn und der Herz- sowie Skelettmuskulatur (57, 62, 77, 112).

Die klinische Signifikanz von CRYAB wird u.a. dadurch deutlich, dass eine maßgebliche Rolle des Proteins bei der Progression von multipler Sklerose nachgewiesen werden konnte (121). Zudem wird CRYAB in Einschlusskörperchen bei zahlreichen weiteren neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alexander, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Alzheimer und Parkinson gefunden (24, 68). Interessanterweise mehrten sich Studienergebnisse, die zeigen, dass sich eine exogene Gabe bzw. systemische Erhöhung von CRYAB positiv auf den Krankheitsverlauf von multipler Sklerose (61, 121, 158), wie auch akuter Läsionen des Rückenmarks (81), Gehirns (8) und Herzens (36), auswirkt. Entscheidend ist dabei wohl die immunmodulierende Eigenschaft von CRYAB (24, 61). So konnte gezeigt werden, dass CRYAB die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine hemmt und damit die

Funktion eines Negativregulators für entzündliche Prozesse besitzt (8, 121). Andere Befunde deuten wiederum darauf hin, dass pro-inflammatorische Zytokine durch CRYAB abgefangen und somit neutralisiert werden (138). Ferner wurde festgestellt, dass eine R120G Missense-Mutation von CRYAB zu Desmin-assoziierten Myopathien führt, die mit einer Muskelschwäche proximaler sowie distaler Gliedmaßen sowie Kardiomyopathien einhergeht (159). Kennzeichnend für diese Erkrankungen sind Aggregate bestehend vor allem aus Desmin sowie CRYAB (144, 162).

Neben der o.g. klinischen Relevanz des Proteins, besitzt CRYAB wichtige Funktionen im physiologischen Kontext. Dazu zählt die Erhaltung der myozellulären Integrität unter Belastungen des Alltags sowie infolge sportlicher Aktivität. Weitere Ausführungen hierzu werden in den nachfolgenden Kapiteln vorgenommen.



**Abbildung 1 Veranschaulichung der Funktion von CRYAB infolge von Zellstress.** Zellstress (u.a. thermisch, chemisch, mechanisch) kann zu einer Entfaltung/Schädigung von Proteinen führen. Entfaltete Proteine verlieren ihre Funktion und neigen zur Bildung von zytotoxischen Aggregaten. CRYAB bindet an sich entfaltende Proteine und stabilisiert diese bzw. kann ihre irreversible Schädigung verhindern. Betroffene Proteine können anschließend in Kooperation mit weiteren, Chaperonen renaturiert oder aber dem autophagosomalen Abbau zugeführt werden.

### 2.3.1 Phosphorylierung von $\alpha$ B-Crystallin an Serin 59

Wie genau CRYAB seine s.g. *Substrat*-Proteine erkennt, ist bislang nicht vollständig geklärt (63). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Phosphorylierung des Proteins eine entscheidende Rolle für dessen Funktion spielt (12, 116). CRYAB besitzt drei Phosphorylierungsstellen mit Serin 19, 45 und 59 (12, 116), wobei Studien darauf hinweisen, dass seine Phosphorylierung an Serin 59 eine wesentliche funktionale Bedeutung hat (32, 39, 77). Gezeigt wurde dies an Kardiomyozyten (57, 58), Neuronen des Hippocampus (142), Kardiomyoblasten der Ratte (145), Skelettmuskel der Maus (83) sowie weiteren

Zellen (71, 92) infolge diverser Stressoren, wie Ischämie (57, 58), Hitze (145), mechanischem Stress (83) und unterschiedlicher Chemikalien (71, 92).

Vermittelt wird die Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 ( $p\text{CRYAB}^{S59}$ ) über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 (1, 71, 92), die ihrerseits über eine Phosphorylierung an Threonin 180 und Tyrosin 182 ( $p\text{p38}^{T180/Y182}$ ) ihre Aktivierung erfährt (169). Im Zuge der  $p\text{CRYAB}^{S59}$  soll das CRYAB Homo-/Heterooligomer destabilisiert und die Bildung kleinerer Oligomere begünstigt werden, was zur Modulation der Aktivität von CRYAB beiträgt (12). Trotz der offensichtlichen Relevanz der  $p\text{CRYAB}^{S59}$  existiert bislang nur eine Studie, die sich damit im humanen Skelettmuskel befasst (50).

### 2.3.2 Regulation von $\alpha\text{B}$ -Crystallin im Skelettmuskel infolge von kontraktionsinduziertem Stress

Ergebnisse aus *in vitro* Studien zeigen klar, dass Zellen, die Stressoren diverser Art (insbesondere thermischer, chemischer Natur) ausgesetzt sind, die Expression von Proteinen des Chaperonsystems, u.a. jener der 70 kDa Hitzeschockproteinfamilie (HSP70) (98) aber auch der kleinen HSPs (62) wie HSPB1 und CRYAB (148), als Schutzmechanismus zur Erhaltung der Proteostase, hochregulieren. *In vivo*, und speziell für den humanen Skelettmuskel, wurde dies vor allem für das 70 kDa Hitzeschockprotein 70 (HSP70) infolge von muskulärer Belastung bzw. kontraktionsinduziertem Stress gezeigt (38, 56, 79, 101, 102, 124, 125). Es wurde/wird daher angenommen, dass auch eine Erhöhung des CRYAB-Pools einen bedeutenden Anpassungsmechanismus darstellt, der die Stressresistenz der Myozyten erhöht. Das Hauptaugenmerk von Studien lag daher primär auf der Expression von CRYAB von akuter sowie wiederholter/chronischer Belastung (sowohl kraft- als auch ausdauerorientiert) (37, 38, 47, 50, 110, 113, 125), sowie passiver Erhöhung der Körpertemperatur (114), gelegt wurde.

#### $\alpha\text{B}$ -Crystallin-Regulation infolge von akuter/einmaliger Belastung

Bisher sind die Befunde bzgl. der Hochregulation des totalen CRYAB im humanen Skelettmuskel infolge einer akuten Belastung eher widersprüchlich als konsistent; einige Studien konnten eine Hochregulation des Proteins zeigen (47, 110, 125), andere wiederum nicht (37, 38, 50, 113). Weitestgehend einheitlich wird jedoch infolge von akutem kontraktionsinduzierten Stress eine Translokation von CRYAB aus dem zytosolischen/sarkoplasmatischen (löslichen) hin zum zytoskelettalen (unlöslichen) Kompartiment beobachtet (37, 38, 50, 58, 110, 126, 161). Dort assoziiert es mit Strukturproteinen der Z-Scheiben bzw. in ihrer direkten Nähe (83, 125), sowie in der Region der I-Bande (59). Dabei wurde akkumuliertes CRYAB sowohl in Arealen ultrastruktureller Schädigung beobachtet (125) als auch an scheinbar ultrastrukturell intakten Intermediärfilamenten wie Desmin (59, 125).

Während die Expression (wenn auch mit kontroversen Ergebnissen), sowie die Translokation des Proteins im Skelettmuskel extensiv erforscht wurden, ist weitaus weniger zur Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 infolge von kontraktionsinduziertem Stress bekannt. Diese haben im humanen Skelettmuskel bisher lediglich Frankenberg et al. (50) untersucht und konnten zeigen, dass kontraktile Aktivität nur unter bestimmten Voraussetzungen, bezogen auf die Belastungsnormative, zu einem akuten deutlichen Anstieg der  $pCRYAB^{559}$  führt. Interessanterweise resultierten lediglich exzentrische, nicht aber konzentrische Kontraktionsmuster in einem Anstieg der Phosphorylierung. Gestützt werden diese Ergebnisse von Koh und Escobedo (83), die *in situ* EDL (*extensor digitorum longus*) Muskeln von Mäusen entweder isometrischen oder exzentrischen Kontraktionen aussetzten. Auch hier führte lediglich die exzentrische, nicht aber die isometrische Belastung zu einem Anstieg der Phosphorylierung sowie zu einer Translokation von CRYAB aus dem zytosolischen hin zum zytoskelettalen Kompartiment. Zudem konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass vor allem konzentrische Kontraktionen mit einem höheren energetischen Aufwand (18, 67, 127, 147) und folglich einer höheren metabolischen Stresskomponente einhergehen. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass insbesondere die mechanische Komponente des kontraktionsinduzierten Stresses für die  $pCRYAB^{559}$  verantwortlich ist.

#### $\alpha$ B-Crystallin-Regulation infolge chronischer/wiederholter Belastung

Die Befunde zur Expression des totalen CRYAB infolge von wiederholten Belastungen sind - genauso wie bereits für akute Belastungen beschrieben - kontrovers, mit Studien, die dafür (47, 110, 125) und anderen, die wiederum dagegen sprechen (37, 38, 50, 113). Die nach akuter Belastung einheitlich beobachtete Translokation hin zu Strukturen des Zytoskeletts (vgl. Kap 2.2.2) scheint infolge von wiederholter Belastung abzunehmen, wie es Cumming et al. (37) zeigen konnten. Bestätigt wird dies durch Befunde von Frankenberg et al. (50), die zwar eine Translokation nach einer initialen Belastung feststellen konnten, nicht aber nach neuerlicher Wiederholung derselben binnen acht Wochen. Die Phosphorylierung von CRYAB zwischen erster und zweiter Belastung hingegen blieb unverändert. Darüber hinaus existieren bislang keinerlei Daten zur  $pCRYAB^{559}$  infolge von wiederholter Belastung.

#### Die Fasertypspezifität von $\alpha$ B-Crystallin

Die Menge an Studien zur fasertypspezifischen Expression von CRYAB ist aktuell zwar noch gering, die Ergebnisse aber dennoch einheitlich. Unter Basalbedingungen konnte sowohl im humanen (38, 49, 125) als auch im Skelettmuskel von Ratten (10, 11, 59, 89) ein höherer Gehalt an CRYAB in Typ I, verglichen mit Typ II Fasern, festgestellt werden. Eine genaue Erklärung zur physiologischen Ursache dieser unterschiedlichen CRYAB-Konzentration konnte bislang allerdings keiner Studie entnommen werden. Naheliegend ist jedoch, dass die unterschiedliche Expression von CRYAB in der funktionalen

Spezifik der beiden Faserpopulationen begründet ist (11). Während Typ I Fasern, insbesondere in alltäglichen Situationen, die den größten Teil der Zeit ausmachen, nahezu persistent im Einsatz und dadurch Reizen bzw. potentiell Stress ausgesetzt sind, werden Typ II Fasern primär infolge maximaler bzw. nahezu maximaler neuro-muskulärer Ansteuerung innerviert (16, 17, 45, 131) und daher im Alltag kaum beansprucht. Folglich besteht für einen Muskel, der primär alltäglichen Belastungen ausgesetzt ist, vor allem Bedarf an einem größeren CRYAB-Pool zur Erhaltung der Proteostase (11) in Typ I Fasern. Bestätigung findet diese Annahme durch den Befund, dass im Vergleich zu Untrainierten sowie Krafttrainierten lediglich Ausdauersportler einen erhöhten Gehalt an CRYAB in Typ II Fasern aufweisen, der annähernd dem Niveau der Typ I Fasern entspricht (49). Es wurde angenommen, dass dies eine Konsequenz des erhöhten metabolischen bzw. oxidativen Stresses sein könnte, von dem auch die Typ II Fasern durch das Ausdauertraining betroffen sind, oder aber dass die Beobachtung zurückzuführen ist auf den zwar niedrigintensiven, dafür aber mit hohem Volumen verbundenen mechanischen Stress (49).

Bislang existieren keine Studien, die sich mit der fasertypspezifischen Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 befassen.

#### **2.4 Die Rolle von Desmin im Skelettmuskel**

Damit die Kraft bzw. Verkürzung eines Sarkomers, resultierend aus der Interaktion zwischen Aktin und Myosin, in einer koordinierten Verkürzung des Gesamtmuskels und weiter einer Kraftübertragung auf die Sehne resultiert, ist ein komplexes Netzwerk an myofibrillären Strukturen notwendig. Dieses sich in jeder Fibrille aufspannende Zytoskelett besteht aus einer Vielzahl diverser Filamente samt ihrer *Ankerprotein-Komplexe* und ist für die passive Übertragung der durch die Sarkomere generierten Kraft an benachbarte Strukturen zuständig (für eine umfassende und detaillierte Übersicht des Zytoskeletts wird auf das Review von Henderson et al. (64) verwiesen).

Von besonderer Bedeutung ist dabei das Typ III Intermediärfilament Desmin. Das 53 kDa schwere Molekül bildet sowohl longitudinale Homo- als auch Heteropolymere aus und formt ein dreidimensionales Netzwerk innerhalb der Muskelfasern (64). Desmin assoziiert distal an den Z-Scheiben und verbindet benachbarte Sarkomere sowie Myofibrillen miteinander. Des Weiteren verbindet es die Myofibrillen über Costamere (84) mit dem Sarkolemm, genauso wie mit Mitochondrien und Zellkernen (44, 64). Desmin-Knockout Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass das Protein zwar in frühen Stadien der Myogenese nicht essentiell ist, dafür aber die Pathogenese bei fehlendem Desmin quasi sofort nach der Geburt einsetzt und sowohl Skelett- und Herz- als auch glatte Muskulatur betrifft (93, 111). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die postnatal verstärkt einsetzende Exposition gegenüber mechanischem Stress (94).

Zusammengenommen hat Desmin eine herausragende Bedeutung bei der lateralen Kraftübertragung und der strukturellen Stabilisierung von Myozyten gegenüber mechanischen Einflüssen (94, 109, 123).

#### 2.4.1 Die Regulation von Desmin im Skelettmuskel infolge von kontraktionsinduziertem Stress

Trotz der Bedeutung von Desmin für die mechanische Stabilität von Myozyten, existiert bislang eine nur sehr begrenzte Anzahl an Publikationen, die sich mit der Regulation von Desmin infolge von kontraktionsinduziertem Stress im humanen Skelettmuskel befasst. Diese deuten jedoch einheitlich darauf hin, dass das Intermediärfilament infolge von kontraktiver Aktivität hochreguliert wird, die mit einer hohen mechanischen Spannung einher geht. So konnten Parcel et al. (122) sowie Woolstenhulme et al. (165) zeigen, dass mehrwöchiges, intensives Krafttraining zu einem Anstieg der Desmin-Expression führt. Des Weiteren wurde von einem Desminanstieg als Folge von exzentrischer Lauf- (47) sowie Sprintbelastung auf dem Fahrradergometer (166) berichtet, nicht aber als Folge einer aerob orientierten Dauerbelastung auf dem Fahrradergometer (122).

### 3 Fragestellungen

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass CRYAB eine wichtige Funktion im zellulären Sofortschutzmechanismus gegenüber Stressoren diverser Art zukommt und das Chaperon an der Erhaltung der Proteostase beteiligt ist. Speziell im Skelettmuskel dient CRYAB der Stabilisierung von Komponenten des Zytoskeletts gegenüber kontraktionsinduziertem Stress. Desmin ist ein wesentlicher Akteur innerhalb des zytoskelettalen Netzwerkes, mitverantwortlich für die laterale Kraftübertragung des Aktomyosin-Komplexes und die mechanische Stabilität von Myozyten. Zudem zählt es zu den 'client'-Proteinen von CRYAB. Die Phosphorylierung von CRYAB an Sein 59 wird als ein Schlüsselmechanismus beschrieben, notwendig für die Funktion und protektiven Eigenschaften des Chaperons. Bislang ist die Regulation von CRYAB, insbesondere via Phosphorylierung infolge von kontraktionsinduziertem Stress, im humanen Skelettmuskel nur unzureichend untersucht. So ist unklar, wie sich die Variation wesentlicher Belastungsparameter wie Volumen und Intensität auf die akute  $p$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort, insbesondere auf Einzelfaserebene, auswirkt. Zudem ist noch unerforscht, ob die CRYAB-Regulation infolge von wiederholter Stressexposition moduliert wird.



Daher war es das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit, deren Ergebnisse in zwei Publikationen dargestellt wurden, die folgenden Fragen zu behandeln:

Studie 1 (73): Einfluss einmaliger Belastung auf die akute Regulation von  $\alpha$ B-Crystallin

1. Welchen Einfluss haben unterschiedliche krafttrainingsassoziierte Belastungen auf die fasertypspezifische Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59?
2. Welchen Einfluss haben unterschiedliche krafttrainingsassoziierte Belastungen auf die fasertypspezifische Translokation von CRYAB im humanen Skelettmuskel?
3. Welchen Einfluss hat das Volumen unterschiedlicher krafttrainingsassoziiertes Belastungen auf die fasertypspezifische Phosphorylierung an Serin 59 im humanen Skelettmuskel?

Studie 2 (74): Einfluss chronischer Belastung/regelmäßigen Trainings auf die akute Regulation von  $\alpha$ B-Crystallin

4. Führt chronische Belastung zu einer Modifikation bzw. Abschwächung der CRYAB-Phosphorylierung?
5. Führt eine darauffolgende mehrtägige Entlastungsphase, gefolgt von einer neuerlichen Belastung, zu einem Wiederanstieg der Phosphorylierung von CRYAB?
6. Korrespondiert die zytoskelettale Translokation/Assoziation von CRYAB mit der potenziellen Modifikation des  $\text{pCRYAB}^{S59}$ -Signals infolge der Be- und Entlastungsphasen?
7. Kann angenommen werden, dass die Phosphorylierung von CRYAB auf die mechanische Komponente des kontraktionsinduzierten Stresses infolge der applizierten Belastung zurückzuführen ist?
8. Wie verhält sich die Expression von Desmin als Reaktion auf die Trainings- und nachfolgende Detrainingsphase als Teil des mechanischen Stabilitätsnetzwerkes in Myozyten?
9. Wie verhält sich die Expression von totalem CRYAB als Reaktion auf die Trainings- und nachfolgende Detrainingsphase?
10. Welchen Einfluss hat eine progressive gegenüber einer konstanten Gestaltung der Belastung auf die Regulation von CRYAB und Desmin infolge der Trainings- und Detrainingsphasen?

## **4 Methoden und Ergebnisse**

An dieser Stelle wird auf die veröffentlichten Originalarbeiten, Jacko et al. (2019) und Jacko et al. (2020), verwiesen, die sich im Anhang befinden. Im nachfolgenden Kapitel wird eine Kurzzusammenfassung der Artikel gegeben.

#### 4.1 Kurzzusammenfassungen der Publikationen

**Jacko D, Bersiner K, Hebchen J, de Marées M, Bloch W, Gehlert S. Phosphorylation of  $\alpha$ B-crystallin and its cytoskeleton association differs in skeletal myofiber types depending on resistance exercise intensity and volume (2019). J Appl Physiol 2019, 126 (6).**

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, wie sich singuläre, unterschiedliche krafttrainingsassoziierte Belastungen sowie Volumina auf die Regulation diverser CRYAB Parameter in Typ I und Typ II Fasern des humanen Skelettmuskels auswirken. Konkreter stand im Fokus: Die Expression von CRYAB, die fasertypspezifische Phosphorylierung an Serin 59 sowie die Translokation/Assoziation mit dem Zytoskelett. Hierzu wurden männliche Probanden vier unterschiedlichen Gruppen zugeordnet, innerhalb derer jeder Proband an voneinander getrennten Tagen einer einen, fünf und zehn Sätze umfassenden Belastung des *quadriceps femoris* am Beinstrecker ausgesetzt wurden. Die Belastungsprotokolle innerhalb der Gruppen entsprachen gängigen Krafttrainingsmethoden: Hypertrophie- (HYP), Maximalkraft- (MAX), Kraftausdauer- (KA) orientiert sowie einer niedrigintensiven (NI) Krafttrainingsmethode. Zudem wurde eine weitere, fünfte Gruppe drei Sätzen zu je acht Wiederholungen maximal exzentrischer Belastung (EXZ) ausgesetzt. Muskelbiopsien aus dem *vastus lateralis* wurden unter Ruhe sowie 30 min nach der jeweiligen Belastung entnommen und analysiert. Der Western Blot (Gesamtzelllysate) zeigte einen signifikanten Anstieg der  $p$ CRYAB<sup>559</sup> in den Gruppen HYP, MAX, KA, NI infolge der Fünf- und Zehn-, nicht aber der Ein-Satz-Belastung. Des Weiteren stieg  $p$ CRYAB<sup>559</sup> auch in der EXZ-Gruppe an. In der fasertypspezifischen Auflösung mittels Immunhistochemie (IHC) konnte in allen fünf Gruppen ein Anstieg der Phosphorylierung in Typ I Fasern festgestellt werden. In Typ II Fasern jedoch war  $p$ CRYAB<sup>559</sup> lediglich in der MAX und EXZ Gruppe erhöht, wobei in der EXZ Gruppe das Phosphorylierungsniveau in Typ II Fasern das der Typ I Fasern überstieg. Die Assoziation von CRYAB mit Strukturen des Zytoskeletts folgt der belastungsabhängigen  $p$ CRYAB<sup>559</sup> in den Fasertypen. Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl die Phosphorylierung als auch die Assoziation von CRYAB mit Strukturen des Zytoskeletts in Typ I und Typ II Fasern hochgradig von der Belastungsintensität sowie dem -volumen abhängig sind. Möglicherweise ist dies ein Ausdruck spezifischer Rekrutierungsmuster der Faserpopulation im Zuge der verschiedenen Belastungsmethoden. Wir folgern daraus, dass die Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 die Exposition gegenüber kontraktionsinduziertem Stress in einzelnen Myozyten anzeigt.

**Jacko D, Bersiner K, Schulz O, Przyklenk A, Spahiu F, Höhfeld J, Bloch W, Gehlert S. Coordinated alpha-crystallin B phosphorylation and desmin expression indicate adaptation and deadaptation to resistance exercise-induced loading in human skeletal muscle (2020). Am J Physiol Cell Physiol, 319, 2.**

Nachdem wir die Regulation von CRYAB infolge einmaliger krafttrainingsinduzierter Stressexposition beleuchtet haben, war es das Ziel dieser Studie, zu erforschen, wie sich wiederholte/chronische krafttrainingsassoziierte Belastungen auf die potentielle Modifikation der akuten Regulation von CRYAB, sowie auf Proteine die mit CRYAB in Verbindung stehen, auswirkt. Wie zuvor standen im Fokus die Expression von CRYAB, die fasertypspezifische Phosphorylierung an Serin 59 sowie die Translokation/Assoziation mit dem Zytoskelett. Zudem wurden die Regulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 anhand ihrer Doppelphosphorylierung an Threonin 180 und Tyrosin 182 ( $p38^{T180/Y182}$ ) und die Expression von Desmin untersucht. Des Weiteren wurde die mechanosensitive JNK (c-Jun NH2 terminale Kinase [54 kDa Variante])-Doppelphosphorylierung an Threonin 183 und Tyrosin 185 ( $pJNK^{T183/Y185}$ ) erhoben, um zu demonstrieren, dass die mechanische Komponente ein wesentlicher Teil des induzierten Stresses infolge des applizierten Belastungsprotokolls war. Hierzu führten männliche Probanden binnen sechs Wochen dreizehn Krafttrainingseinheiten am Beinstrecker und an der Beinpresse durch, gefolgt von einer zehntägigen Detrainingsphase und einer anschließenden 14. Einheit. Die Belastungsintensität entsprach dem individuellen 8-12er Wiederholungsmaximum. Biopsien wurden unter Ruhe sowie nach dem 1., 3., 7., 10., 13. und 14. Training aus dem *vastus lateralis* entnommen. Um zu erfassen, ob eine potentielle Desensibilisierung gegenüber dem kontraktionsinduzierten Stress verhindert werden kann, trainierte eine Gruppe mit einem von Anfang bis Ende der Intervention konstanten Gewicht (KON), wohingegen das Trainingsgewicht der anderen Gruppe progressiv angepasst wurde (PROG). Weil jedoch keine Gruppenunterschiede festgestellt werden konnten, wurden beide Gruppen für die Statistik vereint. Es konnte keine signifikante Regulation von p38 und  $p38^{T180/Y182}$  im Zuge der Trainingsperiode festgestellt werden.  $pCRYAB^{S59}$  und  $pJNK^{T183/Y185}$  jedoch stiegen infolge des ersten und somit 'ungewohnten' Trainings stark an. Ab der 10. bis zur 13. Einheit war dieser zuvor verzeichnete Anstieg nicht mehr vorhanden. Nach der zehntägigen Detrainingsphase führte das darauffolgende 14. Training zu einem neuerlichen Anstieg der  $pCRYAB^{S59}$ . Der Desmingehalt war ab der dritten Einheit signifikant erhöht und tendierte zur Abnahme infolge der Belastungspause. Die  $pCRYAB^{S59}$ -Antwort schien dabei in einer Art inversen Beziehung zum Desmingehalt zu stehen. Wir folgern daraus, dass die  $pCRYAB^{S59}$ -Signalantwort eine Zu- sowie Abnahme der Resistenz von Myozyten gegenüber kontraktionsinduziertem mechanischen Stress indiziert. Der Desmingehalt könnte bei der Resistenz gegenüber mechanischem Stress eine entscheidende Rolle spielen, indem die Ausprägung des Desminnetzwerkes den Myozyten eine strukturell mehr oder minder hohe Stabilität verleiht.

## 5 Diskussion

Nachfolgend werden die in Kapitel 3 formulierten Fragen auf Basis der Ergebnisse der durchgeführten Studien beantwortet und im Kontext der aktuellen Studienlage diskutiert.

### 5.1 Ergebnisdiskussion: Effekte akuter Belastung auf die $\alpha$ B-Crystallin-Regulation

1. **Welchen Einfluss haben unterschiedliche krafttrainingsassoziierte Belastungen auf die fasertypspezifische Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59?**
2. **Welchen Einfluss haben unterschiedliche krafttrainingsassoziierte Belastungen auf die fasertypspezifische Translokation von CRYAB im humanen Skelettmuskel?**

→ *CRYAB wird infolge von Krafttrainingsbelastung phosphoryliert und transloziert hin zu Strukturen des Zytoskeletts. Sowohl Phosphorylierung als auch Translokation bzw. Assoziation an das Zytoskelett sind in Typ II Fasern in starkem Maße von der Belastungsart und speziell der Höhe des äußeren Widerstandes abhängig.*

#### 1. Phosphorylierung

Im Gesamtzelllysat ergab die Untersuchung einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 infolge der applizierten Belastungen, wie dies auch bereits durch Frankenberg et al. (50) gezeigt werden konnte. Dieser Anstieg präsentierte sich jedoch für alle hier applizierten Belastungsarten ohne einen Gruppenunterschied. Erst die fasertypdifferenzierte Analyse mittels IHC offenbarte, dass sich die  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> in hohem Maße fasertypspezifisch darstellt. Während alle angewendeten Krafttrainingsmethoden zu einem Anstieg von  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> in Typ I Fasern führten, war in Typ II Fasern ein Anstieg der Phosphorylierung lediglich infolge von Maximalkraft-orientierter sowie maximaler exzentrischer Belastung zu verzeichnen. Es ist bekannt, dass eine Aufregulation der  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> infolge einer stressexpositionsbedingten Störung der Proteostase einen Sofortschutzmechanismus in diversen Zellarten (12) (vgl. auch Kap.2.3.1), und darunter auch in den Myozyten, darstellt (58, 83). Demnach ist anzunehmen, dass insbesondere in Typ II Fasern eine hohe Kraftkomponente ausschlaggebend dafür ist, entsprechende Proteostasestörungen zu induzieren. Es wird jedoch weitestgehend davon berichtet, dass Typ II Fasern anfälliger gegenüber kontraktionsinduzierter Schädigung als Typ I Fasern sind (104, 105, 160). Zurückgeführt wird dies vor allem auf Unterschiede in der Architektur. So besitzen Typ II Fasern u.a. schmalere Z-Scheiben, kleinere Myomesin- und Nebulin-Isoformen sowie steiferes Titin (30, 64). Bei gleichzeitiger Rekrutierung von

Typ I und Typ II Fasern wäre demnach eine stärkere pCRYAB<sup>559</sup> in Typ II Fasern zu erwarten gewesen. Da dies nicht der Fall war, spricht eher für eine differenzierte Rekrutierung. So scheint das Phosphorylierungsmuster weitestgehend dem bereits extensiv untersuchten Prinzip der hierarchischen Rekrutierung der unterschiedlichen Fasertypen im Skelettmuskel zu entsprechen (16, 17, 45, 65, 85, 86). Dieses besagt, dass innerhalb des Fasertypspektrums (I, IIA, IIX), Typ I Fasern stets initial rekrutiert und erst mit steigendem Kraftaufwand Typ IIA und schließlich Typ IIX Fasern additiv hinzugeschaltet werden.

Auf der anderen Seite scheint das Modell der hierarchischen Rekrutierung als Erklärung für unsere Beobachtung stellenweise kontrovers vor dem Hintergrund der Annahme, dass mit zunehmender muskulärer Ermüdung die Rekrutierungsschwelle für Typ II Fasern sinken soll. So berichteten Morton et al. (115) jüngst davon, dass Typ I Fasern unabhängig von der Höhe sowie Dauer der Belastung stets zusammen mit Typ II Fasern rekrutiert werden, sofern die Belastung bis zum Muskelversagen durchgeführt wird. Dies entspricht dem von uns angewendeten Protokoll. Jeder Satz wurde im Bereich des Wiederholungsmaximums (WM) durchgeführt und zog infolge der Fünfsatzbelastung in der HYP sowie KA Gruppe und infolge der Zehnsatzbelastung in den vier Gruppen HYP, KA, MAX und LI eine signifikante muskuläre Ermüdung nach sich (72). Demnach wären vor allem in der HYP und in der KA Gruppe ein Anstieg der pCRYAB<sup>559</sup> neben den Typ I, auch in Typ II Fasern zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war - wohl aber in der MAX Gruppe, in der die fünf Sätze zu keiner ausgeprägten muskulären Ermüdung führten. Tatsächlich konnte jedoch infolge von zehn Sätzen ein Anstieg der pCRYAB<sup>559</sup> zumindest in der HYP Gruppe verzeichnet werden, bei einer gleichzeitigen tendenziellen weiteren Zunahme der muskulären Ermüdung. Zunächst widersprüchlich scheint dabei allerdings, dass in der KA eine gleich starke Ermüdung wie in der HYP Gruppe nach den zehn Sätzen beobachtet wurde, jedoch ohne begleitenden Anstieg der pCRYAB<sup>559</sup>. Möglicherweise war der in der HYP Gruppe höhere mechanische Stress in Kombination mit der muskulären Ermüdung ein wesentlicher Faktor für die Induzierung von CRYAB infolge der Zehnsatzbelastung.

Interessanterweise überstieg in der EXZ Gruppe das pCRYAB<sup>559</sup>-Niveau in Typ II Fasern dasjenige der Typ I Fasern. Dies passt in den Kontext vorangegangener Studien, die primär eine Schädigung in Typ II Fasern infolge von exzentrischer Belastung zeigen (95, 97, 105, 160). Tannerstedt et al. (149) konnten infolge von maximaler exzentrischer Belastung einen signifikanten Unterschied in der Aktivierung von u.a. p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase p38*) sowie von Proteinsynthese-assoziierten Proteinen (u.a. *ribosomal protein S6*, *p70 S6 kinase*, *eucariotic elongation factor 2*) zwischen Typ II und Typ I Fasern (Typ II > Typ I) zeigen. Bekannt ist, dass die p38 MAPK indirekt, über die Aktivierung der MAPKAPK2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*), für die pCRYAB<sup>559</sup> verantwortlich ist (1, 62), wodurch unsere Ergebnisse mit denen von Tannerstedt in Einklang stehen. Ein möglicher Erklärungsansatz dabei wäre eine Umkehr des hierarchischen Rekrutierungsmusters im

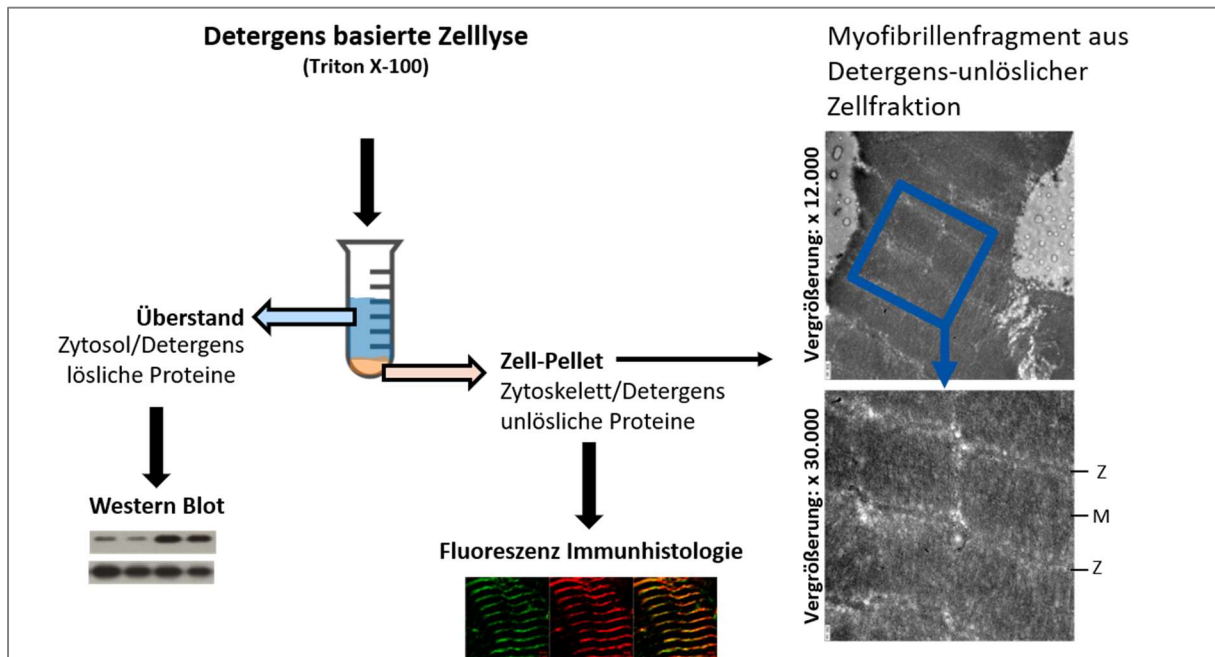
Fälle von maximalen exzentrischen Kontraktionen, wie es von Nardone et al. (117, 118) sowie Linnamo et al. (99) angenommen wurde. Von anderen Gruppen wird eine solche selektive Typ II Faserrekrutierung bzw. eine Umkehr des Rekrutierungsmusters allerdings angezweifelt (14, 17, 28). Weil die Untersuchung von Rekrutierungsmustern jedoch nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit stand, liegen uns hierzu leider keinerlei Daten vor, weshalb diese Kontroverse Gegenstand künftiger Studien bleiben muss.

## 2. Translokation

Weiterhin interessierte uns die Translokation bzw. Assoziation von CRYAB zu zytoskelettalen Strukturen infolge der unterschiedlichen Belastungen. Eine zytoskelettale Assoziation von CRYAB wurde im Gesamtzelllysat bereits zuvor in zahlreichen Studien infolge von Zellstress gezeigt, und zwar induziert durch maximale (110, 125, 126) sowie submaximale (50, 161) exzentrische Kontraktionen, niedrigintensives Krafttraining mit (37, 38) und ohne Blutflussrestriktion (38) sowie Krafttraining hoher Intensität (37). CRYAB assoziiert dabei vor allem mit Strukturen an bzw. in der Nähe der Z-Scheiben (82, 125). Diese gelten als einer der Hauptangriffspunkte mechanischer Spannung während kontraktiver Aktivität (55), weshalb die an ihrem Aufbau beteiligten Proteine verstärkt der Proteinentfaltung und Schädigung unterliegen (51, 83). Diese strukturelle Modifikation wiederum wird durch CRYAB in einer bislang allerdings noch nicht gänzlich verstandenen Weise detektiert (42). Allgemein ist jedoch bekannt, dass die Assoziation von CRYAB der Stabilisierung der betroffenen Strukturen dient und so ihre weitere, potenziell irreversible Schädigung und Degradierung verhindert (82). Neben einer reinen Stabilisierung von Proteinen, werden CRYAB zudem weitere Funktionen zugeschrieben, u.a. der Eingriff in Signalmechanismen durch die Modulation der Aktivität seiner Interaktionspartner (9). So könnte spekuliert werden, dass das Protein durch seine Assoziation mit dem Zytoskelett sowie weiterer bisher nicht charakterisierter Interaktionspartner auch an Prozessen der lokalen Remodellierung myofibrillärer Strukturen beteiligt sein.

Trotz der eindeutigen Datenlage bzgl. der Translokation/Assoziation von CRYAB zum Zytoskelett infolge von kontraktionsinduziertem Stress, existieren für den humanen Skelettmuskel bislang keinerlei Untersuchungen hinsichtlich der Fasertypspezifik. Wir entwickelten daher einen Analyseansatz, der dies ermöglichte (vgl. **Abbildung 2**), und konnten erstmalig zeigen, dass auch die Translokation, wie oben bereits für die Phosphorylierung von CRYAB beschrieben, in seiner Fasertypspezifität in hohem Maße von der Belastungsart abhängt. So konnte eine Detergens-resistente Assoziation von totalem sowie auch phosphoryliertem CRYAB in Typ II Fasern ausschließlich infolge von hohem mechanischen Stress (MAX) beobachtet werden, wohingegen in Typ I Fasern eine Assoziation infolge von hohem (MAX), moderatem (HYP) und niedrigem (KA) mechanischen Stress ersichtlich war.

Diese Beobachtung, zusammen mit der fasertypspezifischen  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort, legt nahe, dass CRYAB ein sensibler Indikator für das Stresserleben des Muskels auf Einzelfaserebene darstellt. Dabei erlaubt es die Signalantwort, das Potenzial von Belastungen einzuschätzen, in verschiedenen Faserpopulationen differenziert (mechanischen) Stress zu induzieren und damit potenziell Anpassungsreaktionen auszulösen.



**Abbildung 2 Veranschaulichung des 1. Versuchsaufbaus bzgl. Assoziation von CRYAB mit dem Zytoskelett.** Das Muskelgewebe wurde zunächst mechanisch zerkleinert, einer Detergen (Triton® X-100) basierten Lyse unterzogen und anschließend zentrifugiert um das Lysat/den Überstand von der unlöslichen Fraktion/Zell-Pellet zu trennen. Die lösliche Fraktion wurde für die Gelelektrophorese und anschließenden Western Blot verwendet; das Zell-Pellet wurde am Kryomikrotom geschnitten und anschließend mittels Fluoreszenz Immunhistologie analysiert. Ein Teil des Zell-Pellets wurde für elektronenmikroskopische Aufnahmen verwendet (rechte Seite), um die Intaktheit von sarkomerischen Strukturen zu prüfen. Z= Z-Streifen; M= M-Linie. Weitere Informationen hierzu finden sich in der Originalpublikation (73).



### 3. Welchen Einfluss hat das Volumen unterschiedlicher krafttrainingsassoziiertes Belastungen auf die fasertypspezifische Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 im humanen Skelettmuskel?

→ *CRYAB wird infolge einer Akkumulation des Belastungsvolumens (multipler Sätze) phosphoryliert. Die Phosphorylierung von CRYAB in Typ II bedarf entweder hoher Belastungsintensitäten (hoher zu bewegendere Lasten), oder aber eines hohen Belastungsvolumens in Kombination mit ‚relativ hoher‘ Intensität.*

Ein Anstieg der  $p$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort konnte in allen vier Gruppen (MAX, HYP, KA, NI) infolge von multiplen Sätzen (fünf, zehn), nicht aber resultierend aus der Durchführung eines Einzelsatzes beobachtet werden. Davon ausgehend, dass CRYAB infolge von Zellstress und struktureller Proteinmodifikation bzw. -entfaltung induziert wird (58, 71, 83, 92), könnte die Belastungsvolumen-abhängige Phosphorylierung als die Reaktion auf eine Art der Materialermüdung zurückgeführt werden, wie es bereits Warren et al. (164) vorgeschlagen haben. Sie unterzogen Rattenmuskeln *in vitro* einer zunehmenden Anzahl an exzentrischen Kontraktionen und analysierten Parameter der strukturellen Schädigung. Aus ihren Ergebnissen folgerten sie, dass unter physiologischen Bedingungen kontraktionsinduzierte Muskelschädigung aus dem kumulativen Effekt multipler Kontraktion resultiert, und weniger aus einer Einzelaktion, die die Zugfestigkeit der Strukturen übersteigt. Demnach führen wiederholte Deformationen des ‚Materials‘ bzw. der Proteine zunächst zu kleinstmodifikationen, die sich mit zunehmender Wiederholungsanzahl in einem progressiven Nachgeben des ‚Materials‘ und struktureller Schädigung manifestieren (164). Bestätigung findet diese Annahme durch Befunde von Schaedel et al. (140), die die Auswirkungen von mechanischem Stress auf Mikrotubuli untersuchten, indem sie diese einem transienten hydrodynamischen Fluss aussetzten. Die mit jedem weiteren Flusszyklus zunehmende Schädigung der Mikrotubuli führten auch sie auf eine Art der Materialermüdung zurück. Wenn auch der Übertrag dieser Befunde auf ein komplexes Organ wie den Skelettmuskel *in vivo* nur bedingt möglich ist, könnte ein vergleichbares Prinzip für die Induzierung von mechanischem Stress infolge von wiederholter kontraktile Aktivität angenommen werden. Die Akkumulation der Zyklen/Wiederholungen, in denen die mechanische Spannung auf die an der Kontraktion beteiligten Strukturen wirkt, könnte zu ihrer graduellen Modifikation und Schwächung führen, bis hin zu einem Punkt, an dem eine (messbare) Stressabwehr bzw. Stabilisierungsreaktion wie die Induzierung von CRYAB notwendig wird.

In allen vier Gruppen war die  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> infolge der Absolvierung von fünf Sätzen erhöht gegenüber der Ruhebedingung. Auch die Absolvierung von zehn Sätzen resultierte zwar in einem deutlichen Anstieg von  $p$ CRYAB<sup>S59</sup> gegenüber Ruhe, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied gegenüber der

Fünfsatzbelastung. Interessanterweise war einzig in der MAX Gruppe nach zehn Sätzen kein signifikanter Anstieg der CRYAB-Phosphorylierung zu verzeichnen. Dieses zunächst kontrovers erscheinende Ergebnis lässt sich jedoch vor dem Hintergrund des Studiendesigns diskutieren.

Primäres Ziel der Studie war es, die Akuteffekte von einmaligen Belastungen verschiedener Art und unterschiedlichen Volumens zu untersuchen. Dabei absolvierte jeder Proband innerhalb seiner Belastungsgruppe alle drei Volumina an unterschiedlichen Tagen und einem entsprechenden zeitlichen Abstand voneinander, um potenzielle Anpassungseffekte zu vermeiden. Begonnen wurde mit der Ein-, gefolgt von der Fünf- und zuletzt Zehnsatzbelastung [eine detaillierte Beschreibung findet sich in (72)]. In einer vorangegangenen Studie konnten wir bereits zeigen, dass auf diese Weise eine Anpassung im Sinne einer Steigerung der maximalen willkürlichen isometrischen Kraft verhindert werden konnte. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Akkumulation der Einzelbelastungen zu gewissen Anpassungseffekten führte, die sich jedoch nicht zwangsläufig in einer Steigerung der isometrischen Maximalkraft widerspiegeln. So ist aus anderen Studien bekannt, dass vorzugsweise Belastungen, die mit einer hohen mechanischen Kraftkomponente einhergehen, zu einer Aufregulation von zytoskelettalen Proteinen wie Filamin C (156), Aktin (156, 168) und vor allem Desmin (13, 47, 122, 165, 168) führen. Wir vermuten daher, dass in der MAX Gruppe die hohe Kontraktionskraft und damit einhergehend der hohe mechanische Stress einen wesentlichen Reiz darstellt, der zu einer Verstärkung von Komponenten des Zytoskeletts geführt haben könnte. Resultierend wäre eine höhere Resistenz der Zellen gegenüber wiederholtem mechanischen Stress und dadurch das beobachtete Ausbleiben der akuten Stressabwehrreaktion via  $p$ CRYAB<sup>559</sup> annehmbar.

Auch wenn in der vorliegenden Untersuchung die konkreten Ursachen für die fasertypspezifische  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort nicht anhand von eigenen Originaldaten beantwortet werden konnte, so wurde dennoch klar demonstriert, dass sich die behandelten Krafttrainingsmethoden hinsichtlich ihres Potentials, insbesondere in Typ II Fasern Stress zu induzieren, bedeutend voneinander unterscheiden. Nachfolgend wird diese Tatsache einer pragmatischen Betrachtung hinsichtlich der Trainingspraxis unterzogen.

Ausgehend von der Annahme, dass die Induzierung von Stress und die damit einhergehende Stressantwort Grundlage für eine Anpassung darstellt, würde dies bedeuten, dass vor allem das Bewegen hoher äußerer Widerstände notwendig ist, um die Grundlage für eine Anpassung des gesamten Faserspektrums (inklusive Typ II) zu legen. Bei tendenziell niedrigeren Lasten (im Bereich des 10er WM) hat ein höheres Belastungsvolumen zu einer  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort auch in Typ II Fasern geführt, nicht jedoch, wenn die Last noch geringer war (25er WM [KA-Gruppe]; 70% des 10er WM [NI-Gruppe]). Daraus lässt sich folgern, dass das Belastungsvolumen, die bis zu einem gewissen Grad niedrigere mechanische Komponente anteilig kompensieren könnte. Dies würde bedeuten, dass für

eine Induzierung von Stress in Typ II Fasern (zusätzlich zu Typ I) primär die Verwendung hoher Widerstände (~3er WM) oder sekundär mittlerer Widerstände (~10er WM), dann aber in Kombination mit einem hohen Belastungsvolumen (>5 Sätze), notwendig ist. Wenn es das Ziel ist, selektiv bzw. vorzugsweise in Typ II Fasern Stress zu erzeugen, um eine potenzielle Anpassung zu induzieren, scheinen maximal exzentrische Belastungen geeignet zu sein, was auch durch andere Studien gestützt wird (95, 97, 149).

Es ist dabei anzumerken, dass wenn an dieser Stelle von Anpassung gesprochen wird, auf der Datengrundlage der vorliegenden Arbeit zunächst eine Anpassung im Sinne einer erhöhten Resistenz gegenüber dem gegebenen Stressor gemeint ist, ohne dabei den genauen Mechanismus dieser potenziellen Resistenz benennen zu können. Mit Verweis auf die zweite Publikation (74) könnte man jedoch von einer strukturellen Stabilisierung der Myozyten infolge erhöhter Expression zytoskelettaler Komponenten wie Desmin ausgehen. Möglich, und auf der Grundlage der Ergebnisse von Tannerstedt et al. (149) auch wahrscheinlich, sind im Kontext wiederholter Belastung, Hypertrophie-assoziierte Anpassungen in  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>- bzw. stresspositiven Faserentitäten infolge der entsprechenden Belastungsmodi (vgl. Kap. 5.1; 1. Phosphorylierung). Eine Klärung dieser Sachverhalte bleibt weiteren Studien vorbehalten, wird aber in Teilen in den nachfolgenden Abschnitten der vorliegenden Arbeit aufgegriffen.

## **5.2 Ergebnisdiskussion: Effekte chronischer Belastung auf die $\alpha$ B-Crystallin-Regulation**

Insbesondere die vermeintlich 'beiläufige' Beobachtung, dass die  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>-Signalantwort durch wiederholte Belastung scheinbar modifiziert werden kann und möglicherweise ein Ausdruck erhöhter zellulärer Resistenz gegenüber mechanischem Stress ist, führte zu der zweiten Studie. Im Zuge dieser wurde sich den nachstehenden Fragen gewidmet, die anschließend diskutiert werden. An dieser Stelle wird die in Kap. 3 (Fragestellungen) unter Punkt 10 formulierte Frage bzgl. eines Unterschiedes in der CRYAB- und Desmin-Regulation zwischen einem konstanten und progressiven Belastungsmuster vorweggenommen. Es konnte diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Zwecks weiterer statistischer Auswertung wurden daher die Probanden beider Gruppen zusammenfassend betrachtet. Eine entsprechende Diskussion erfolgt in Kap. 5.3 (Methodendiskussion). Alle weiteren Fragen werden in der unter Kap. 3 formulierten Reihenfolge behandelt.

4. **Führt chronische Belastung zu einer Modifikation bzw. Abschwächung der CRYAB-Phosphorylierung?**
5. **Führt eine darauffolgende mehrtägige Entlastungsphase, gefolgt von einer neuerlichen Belastung, zu einem Wiederanstieg der Phosphorylierung von CRYAB?**
6. **Korrespondiert die zytoskelettale Translokation/Assoziation von CRYAB mit der potenziellen Modifikation des  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Signals infolge der Be- und Entlastungsphasen?**

➔ *Chronische Belastung führt zu einer graduellen Abschwächung der akuten  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort und eine Entlastungsphase führt zu einem neuerlichen Anstieg. Dabei scheint die Translokation von CRYAB unter bestimmten Umständen nicht dem  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Muster zu folgen.*

#### 4., 5. Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59

##### Globale/Fasertypunspezifische Betrachtung

Wie bereits zuvor gezeigt (74), führte eine erste, 'ungewohnte' Belastung zu einem starken Anstieg der  $p$ CRYAB<sup>559</sup>. Als Folge weiterer Trainingseinheiten verringerte sich die Nachbelastungs- $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort graduell, bis ab der 10. Einheit kein signifikanter Anstieg mehr zu verzeichnen war. Nach zehn Tagen Belastungspause/Detraining und nachfolgender 14. Einheit konnte jedoch ein Wiederanstieg der  $p$ CRYAB<sup>559</sup> beobachtet werden. Damit konnten wir erstmalig die  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Regulation zeitlich relativ hochauflösend im Zuge einer mehrwöchigen Belastungs- sowie Entlastungsperiode demonstrieren. Zuvor wurde die Phosphorylierung von CRYAB infolge wiederholter Belastung in lediglich einer weiteren Studie untersucht. Dabei konnten Frankenberg et al. (50) keinen Unterschied in der  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort zwischen einer ersten und zweiten exzentrischen Belastung feststellen. Es muss jedoch angemerkt werden, dass zwischen beiden Einheiten acht Wochen lagen. In der vorliegenden Studie reichte eine Dauer von zehn Tagen aus, damit eine zuvor nach zehn Einheiten verschwundene  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort abermals signifikant anstieg.

Ausgehend davon, dass die  $p$ CRYAB<sup>559</sup> infolge von zellstressbedingter Störung der Proteostase bzw. struktureller Schädigung (58, 71, 83, 92) hochreguliert wird, muss das Ausbleiben einer solchen  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort dahingehend interpretiert werden, dass ein gegebener Reiz keine solchen Störungen nach sich zieht. Folglich konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse, bzw. der  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort, eine klare De- und Resensibilisierung gegenüber (mechanischem) krafttrainingsinduziertem Zellstress gezeigt werden. Diese Signalantwort ist zum einen interessant vor dem Hintergrund der potenziellen Verstärkung passiv kraftübertragender zytoskelettaler Strukturen (s. Kap.7). Zum anderen könnte die beobachtete  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort interessant sein im Kontext der trainingsinduzierten 'klassischen' Muskelhypertrophie, die gemeinhin einen Anstieg des Faserquerschnitts, bedingt durch

die Zunahme kontraktile, sarkomere Einheiten, meint. Eine solche Muskelhypertrophie ist schlussendlich das Resultat kumulativer Perioden einer positiven Proteinsynthesebilanz (40). Dies bedeutet, dass eine größere Menge an Proteinen neu synthetisiert, als degradiert werden muss, um einen Zuwachs an Skelettmuskelmasse zu verzeichnen. Laut Damas et al. (40), ist dies nach frühestens 8-12 Trainingseinheiten der Fall. Wir konnten nach zehn absolvierten Trainingseinheiten eine deutliche Abnahme der  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup> Antwort zeigen. Möglicherweise könnte  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup> damit einen Schnittpunkt kennzeichnen, an dem eine positive Proteinsynthesebilanz resultiert. So könnte angenommen werden, dass zu diesem Zeitpunkt zwei die Hypertrophie begünstigende Faktoren zusammenkommen: 1. Die Belastung induziert zum einen die Proteinsynthese über einschlägig bekannte Signalwege wie den mTOR- (*mechanistic/mammalian target of rapamycin*) Pfad (120) und 2., die Stressresistenz der Muskelfasern ist zum genannten Zeitpunkt ausgeprägt genug, um Degradierungsprozesse zu minimieren.

Diesbezüglich müssten Folgeuntersuchungen durchgeführt werden, die neben den einschlägig bekannten indikativen Proteinsynthese-Signalwegen *up-* sowie *downstream* des mTOR-Komplexes im Gesamtmuskel auch Prozesse der Protein-Degradierung mitberücksichtigen. Im Speziellen sollte dabei die Regulation von Komponenten der CASA (*chaperone-assisted selective autophagy*)-Maschinerie untersucht werden; diese ist für den Abbau, der infolge von mechanischem Stress entfaltenen Proteine, von besonderer Bedeutung (35).

#### Fasertypspezifische Betrachtung

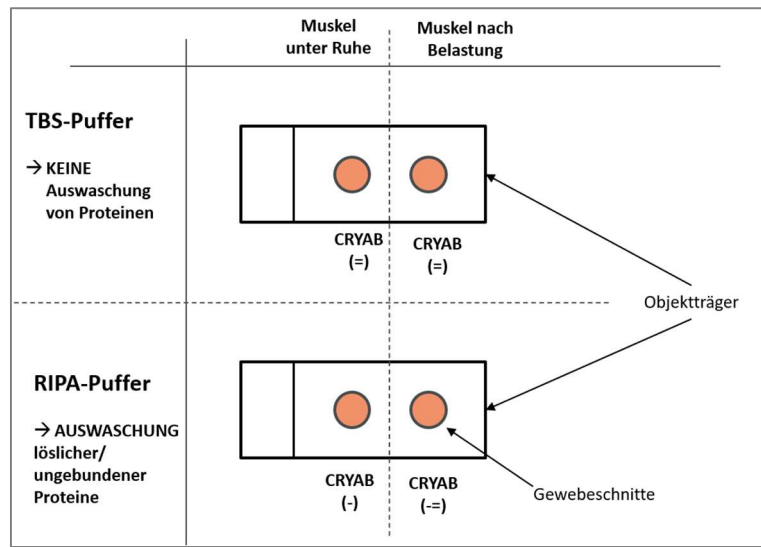
Eine fasertypspezifische Betrachtung der  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>-Regulation bestätigte die o.g. Ergebnisse aus dem Gesamtzelllysat. Bzgl. der Fasertypspezifität zeigte sich wie zuvor (73) infolge von Belastungen, die im Bereich des 10er WMs liegen, eine höhere Phosphorylierung in Typ I gegenüber Typ II Fasern. Anzumerken ist: die Phosphorylierung war zwar niedriger in Typ II als Typ I Fasern, dennoch konnte ein signifikanter Anstieg gegenüber der Ruhebedingung beobachtet werden. Dies war in der vorangegangenen Studie jedoch nicht der Fall, zumindest nicht resultierend aus der Fünfsatzbelastung – wohl aber infolge eines höheren Belastungsvolumens (vgl. Diskussion Kap. 5.1; Punkt 3). In der vorliegenden Studie wurden insgesamt sechs Sätze, verteilt auf zwei unterschiedliche Übungen (Beinstrecker, Beinpresse), durchgeführt. Dies ist zwar lediglich ein Satz mehr als die genannten fünf, aber könnte wie bereits in Kapitel 5.1 unter Punkt 3 diskutiert, zur Involvierung der Typ II Fasern geführt haben und somit das Ergebnis der vorangegangenen Studie bestätigen (Induzierung muskulärer Ermüdung → Herabsetzung der Rekrutierungsschwelle der Typ II Fasern → Exposition gegenüber mechanischem Stress).

Ferner konnten wir infolge von chronischer Belastung eine zeitliche Divergenz in der Abnahme der  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort zwischen Typ I and Typ II Fasern beobachten. Während in Typ I Fasern das  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>-Signal erst nach der zehnten Einheit signifikant verringert war gegenüber dem Signal nach der ersten Einheit, war dies in Typ II Fasern nach bereits drei Einheiten der Fall. Erneut beziehungsweise auf den oben bereits diskutierten Kontext der Muskelhypertrophie, wäre unsere Beobachtung im Einklang mit den Befunden von Snijders et al. (146). Im Rahmen einer zwölfwöchigen Trainingsphase (3 Einheiten pro Woche mit 80% des 1er WM) stellten diese fest, dass der Faserquerschnitt von Typ II Fasern bereits nach zwei Wochen signifikant anstieg, wobei dies in Typ I Fasern erst nach acht Trainingswochen der Fall war. Man könnte spekulieren, dass eine schnellere Zunahme der Stressresistenz von Typ II Fasern Degradierungsprozesse eher reduziert, wodurch im Vergleich zu Typ I Fasern bereits frühzeitig ein Hypertrophie-begünstigendes Milieu geschaffen wird.

#### 6. Translokation/Assoziation zu zytoskelettalen Strukturen

Um die Assoziation von CRYAB mit dem Zytoskelett und die potenzielle Modifikation dieser Assoziation, im Laufe der Belastungsperiode zu untersuchen, nutzten wir eine Weiterentwicklung des für die vergangene Studie konzipierten Analyseansatzes (vgl.5.1; Punkt 2) . Erneut konnten wir einen deutlichen Übergang von CRYAB aus dem ungebundenen, Detergens-löslichen Zustand unter Ruhebedingung, hin zu einem Detergens-unlöslichen bzw. zytoskelettal-assoziierten Zustand infolge von kontraktionsinduziertem Stress beobachten. Wir erwarteten, dass infolge der chronischen Belastungsphase die zytoskelettale Assoziation von CRYAB dem Phosphorylierungsmuster folgt, ergo abnimmt. Es war jedoch kein Unterschied nach der 13. im Vergleich zur 1. Trainingseinheit erkennbar. Auf der einen Seite unterstützt diese Beobachtung (Divergenz zwischen der Phosphorylierung von CRYAB und seiner Assoziation mit dem Zytoskelett) vorangegangene Studien, in denen angenommen wurde, dass die Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 nicht das alleinige Kriterium für seine Substratbindung ist (50, 90). Auf der anderen Seite steht unser Befund jedoch im Widerspruch zu vorangegangenen Studien. So konnten Cumming et al. (37) zeigen, dass die Translokation von CRYAB infolge von zwölfwöchigem intensiven sowie blutflussrestriktiertem Krafttraining abnahm. Weiter stellten Frankenberg et al. fest, dass die Wiederholung einer exzentrischen Belastung nach acht Wochen ebenfalls zu einer reduzierten Translokation führte. Diese mit unserem Befund in Konflikt stehenden Ergebnisse könnten jedoch auf der Grundlage unterschiedlicher Analyseverfahren erklärbar sein. In anderen Studien, zu denen auch die beiden o.g. zählen, wurde stets auf Gesamtzelllysate zurückgegriffen, die einer detergensbasierten Fraktionierung unterzogen werden, mit anschließender Detektion entsprechender Proteine in den unterschiedlichen Fraktionen mittels Western Blot. Hingegen war unser Ansatz, ungebundene Proteine mittels detergenshaltigem Puffer aus Gewebeschnitten zu waschen, die auf Objektträgern fixiert waren (IHC). Es ist durchaus plausibel, dass

die Homogenisierung von Gewebe Proteine der Lyse zugänglicher macht, als wenn sie sich in strukturell relativ intakten Verbund befinden. Daher wäre es denkbar, dass die Assoziation von CRYAB mit dem Zytoskelett nach der 13. Einheit tatsächlich schwächer ist als nach der initialen 1. Einheit, jedoch immer noch intensiv genug, um der Auswaschung in der IHC zu widerstehen; anders als wenn das Gewebe zuvor mechanisch homogenisiert wurde. Sollte sich dies bestätigen lassen, wäre die Analyse hinsichtlich unterschiedlicher Bindungsaffinitäten von CRYAB ein vielversprechender weiterer Schritt, um die multimodale Funktion des Proteins besser zu verstehen.



**Abbildung 3 Veranschaulichung des 2. Versuchsaufbaus bzgl. Assoziation von CRYAB mit dem Zytoskelett.** Gewebeschnitte, jeweils einer, einer vor- sowie Nachbelastungssituation, wurden auf Objektträger aufgetragen. Ein Objektträger wurde als Kontrolle benutzt und mit einem standard, Detergens-freien, TBS (*tris buffered saline*)-Puffer behandelt; der zweite Objektträger wurde mit einem Detergens-haltigen RIPA (Radioimmunoprecipitationsassay)-Puffer behandelt. Anschließend erfolgte eine Immunfloreszenz basierte Analyse gegen CRYAB. Die TBS-Behandlung führte zu keiner erkennbaren Auswaschung von CRYAB (=), weder unter Ruhe noch nach Belastung. Die RIPA Behandlung hingegen resultierte in einer Auswaschung von CRYAB aus Zellen der Ruhebedingung (-); gleichzeitig blieb CRYAB jedoch in der Nachbelastungsbedingung in diversen Zellen nachweisbar (-=). Weitere Informationen hierzu finden sich in der Originalpublikation (74).

## **7. Wie verhält sich die Expression von Desmin als Reaktion auf die Trainings- und nachfolgende Detrainingsphase als Teil des mechanischen Stabilitätsnetzwerkes in Myozyten?**

→ *Desmin erfährt infolge von chronischer Belastung eine Hoch- und infolge von Entlastung eine Runterregulation. Die Phosphorylierung von CRYAB und Menge an Desmin stehen damit in einer Art inverser Beziehung zueinander.*

Es ist einheitlich anerkannt, dass ein Anstieg der Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 eine zelluläre Antwort auf ihre Exposition gegenüber Stress (7, 12, 32, 33, 43, 58, 71, 90–92, 157) und konkreter kontraktionsinduziertem Stress ist (50, 73, 82). Davon ausgehend muss der hier beobachtete graduelle Abfall der  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>-Antwort infolge wiederholter gleichartiger Stressreize das Resultat einer Desensibilisierung und erhöhter Resistenz gegenüber entsprechendem Stress sein. Es stellt sich dabei die Frage nach der Art der Anpassung, die erfolgen muss, um die myozelluläre Resistenz gegenüber kontraktionsinduziertem Stress zu erhöhen.

Wir konnten dabei erstmalig in zeitlich relativ hoher Auflösung die Aufregulation von Desmin infolge einer mehrwöchigen Trainingsphase zeigen. Zudem konnte eine Tendenz zur Runterregulierung des Desmins infolge einer zehntägigen Entlastungsphase demonstriert werden. Hoch- und Runterregulation von Desmin folgten somit in inverser Weise dem von uns beschriebenen  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup>-Muster.

Desmin ist ein besonders prominenter Akteur im Ensemble des zytoskelettalen Netzwerkes. Es ist verantwortlich für die Verbindung benachbarter Sarkomere, sowie Verbindung dieser mit dem Sarkolemm, die laterale Kraftübertragung und die mechanische Stabilität von Z-Streifen und der Myozyten insgesamt (94, 109, 123). Vorangegangene Studien deuten darauf hin, dass eine Remodellierung von Desmin abhängig ist vom Grad des induzierten mechanischen Stresses. So konnte eine Desmin-Aufregulation infolge von exzentrischem Training (13, 47, 168) und Standardkrafttraining (gemeint ist ein Bewegungsmuster mit konzentrischen, isometrischen und exzentrischen Anteilen) (13, 122, 165), sowie Sprintbelastungen (166), nicht aber infolge aerob orientierter Ausdauerbelastung auf dem Fahrradergometer (122) beobachtet werden. Um die Bedeutung der Höhe des mechanischen Stresses für die Desmin-Remodellierung zu untermauern, reanalysierten wir Proben unserer vorangegangenen Studie und verglichen die Desminregulation nach der Zehnsatzbelastung zwischen der MAX (hoher mechanischer Stress) und NI (geringer mechanischer Stress) Gruppe. Tatsächlich konnte lediglich nach Maximalkraft-orientiertem, nicht aber nach niedrigintensivem Krafttraining eine signifikante Zunahme von Desmin beobachtet werden. Anzumerken ist, dass ebenfalls ausschließlich in der MAX Gruppe kein signifikanter Anstieg von  $\rho$ CRYAB<sup>S59</sup> zu beobachten war, wie in unserer vorangegangenen Publikation gezeigt (73). Basierend auf der Bedeutung von Desmin für die passive



Kraftübertragung und strukturelle Stabilität, nehmen wir an, dass eine Erhöhung der Desminmenge mit einer Verstärkung des zytoskelettalen-Netzwerkes einhergeht und dadurch die Resistenz der Myozyten gegenüber mechanischem Stress erhöht wird (13, 47, 122, 125, 165). Durch eine Art 'Verdünnung' des induzierten Stresses, wären die an der Kontraktion beteiligten Strukturen weniger anfällig für ihre Entfaltung bzw. Schädigung. Eine abgeschwächte Induzierung der akuten Stressabwehrmaschinerie in Form verringerter CRYAB-Phosphorylierung, wie es durch unsere Ergebnisse gezeigt wurde, wäre die logische Folge.

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Hoffmann et al. (66). Sie setzten Fibroblasten zyklischer uniaxialer Dehnung aus. Dabei stellten sie fest, dass HSPB1 bzw. seine Phosphorylierung ein wichtiger Faktor für die beobachtete dehnungsinduzierte Stärkung der Aktin-Stressfasern ist. Bei HSPB1 handelt es sich, wie auch im Falle von CRYAB, um ein Chaperonmolekül aus der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (9). Aufgrund des 'Verwandtschaftsverhältnisses', aber vor allem der Tatsache, dass beide Proteine sehr ähnliche Eigenschaften besitzen (157), könnte spekuliert werden, dass CRYAB selbst eine Rolle bei der Aufregulation von Desmin spielt und die  $pCRYAB^{S59}$  dabei einen modulierenden Effekt hat.

Zusammenfassend wird angenommen, dass der Anstieg der Desminmenge im Skelettmuskel infolge von wiederholter Belastung mit einer höheren mechanischen Stabilität und Stressresistenz der Myozyten einhergeht. Wesentlich für diese Anpassung ist dabei die Höhe der mechanischen Stresskomponente. Der relativ frühe Zeitpunkt innerhalb der Trainingsphase, ab dem Desmin hochreguliert war – bereits nach der 3. Trainingseinheit – deutet an, dass es sich dabei um ein von der klassischen Muskelhypertrophie unabhängiges Anpassungsphänomen handelt.

#### **8. Wie verhält sich die Expression von totalem CRYAB als Reaktion auf die Trainings- und nachfolgende Detrainingsphase?**

→ *Es konnte keine signifikante Aufregulation des totalen CRYABs im Gesamtzelllysat festgestellt werden – weder infolge unterschiedlicher einmaliger, noch infolge chronischer Belastung.*

Eine der oft beschriebenen Funktionen von CRYAB besteht darin, zytoskelettale Strukturen infolge von Zellstress akut zu stabilisieren, um eine potenziell umfassendere Schädigung zu reduzieren (92). Das Zytoskelett des Muskels ist kontraktionsbedingt hoher Spannungseinwirkung ausgesetzt (55), die speziell infolge exzentrischer Belastung zur Schädigung führen kann (52, 83, 96, 97, 137). Es besteht daher die Annahme, dass eine Erhöhung des CRYAB-Pools eine Anpassungsreaktion darstellen könnte, die den Muskel vor wiederholter Belastung schützen könnte. Bis dato gibt es allerdings keine

einheitlichen Befunde hierzu, da einige Gruppen eine Aufregulation der CRYAB-Menge infolge kontraktiver Belastung finden konnten, andere wiederum nicht (vgl. Kap. 2.3.2). Die Ergebnisse unserer eigenen Studien lassen uns zu zweiterer Gruppe zählen; weder infolge einmaliger (73) noch chronischer Belastung (74) konnten wir einen signifikanten Anstieg der CRYAB-Menge beobachten. Nachfolgend soll versucht werden, diese bisher scheinbar widersprüchlichen Befunde anhand der Unterschiede im Belastungsdesign der einzelnen Studien zu beleuchten.

Es fällt die Tendenz auf, dass vorzugsweise in Studien von einer Zunahme berichtet wird, wenn die applizierte Belastung primär exzentrischer Natur war (47, 110, 126), oder aber mit hohen relativen Lasten gearbeitet wurde (124), nicht aber wenn die relativen Lasten niedrig (38, 50) bis moderat (37) waren, oder Ausdauerbelastungen appliziert wurden (113). Larkins et al. (89) konnte anhand von Muskelfasern der Ratte eindrucksvoll zeigen, dass die absolute CRYAB-Menge in Typ I Fasern ausreichend hoch ist, um mit nahezu allen potentiellen Partnerproteinen zu assoziieren. Hingegen ist die CRYAB-Menge in Typ II Fasern weitaus geringer, was auch für den humanen Skelettmuskel zutrifft (38, 125). Folglich bestünde keine zwingende Notwendigkeit, in Typ I Fasern die Gesamtmenge des CRYABs zu erhöhen, im Sinne eines Anpassungseffektes zum Schutz gegenüber wiederkehrenden Belastungen – anders als in Typ II Fasern. In unserer Studie konnten wir anhand der  $p$ CRYAB<sup>559</sup> zeigen, dass Typ II Fasern primär infolge maximaler exzentrischer, sowie Belastungen gegen hohe Widerstände (3er Wiederholungsmaximum) Stress erfahren. Zusammenfassend ließe sich vermuten, dass eine Aufregulation des totalen CRYAB, die im Gesamtzelllysate festgestellt wird, vor allem auf eine Zunahme in Typ II Fasern zurückzuführen ist. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, weshalb insbesondere in denjenigen Studien von einer erhöhten CRYAB-Expression berichtet wurde, deren Interventionen exzentrische Belastungen und solche gegen hohe relative Widerstände beinhalteten.

**9. Kann angenommen werden, dass die Phosphorylierung von CRYAB zurückzuführen ist auf die mechanische Komponente des kontraktionsinduzierten Stresses infolge der applizierten Belastung?**

→ *Auf der Grundlage der Untersuchung der mechanosensitiven  $p$ JNK<sup>T183/Y185</sup> kann davon ausgegangen werden, dass die mechanische Komponente Teil des kontraktionsinduzierten Stresses und somit an der Modifikation der  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort beteiligt war.*

Kontraktionsinduzierter Stress im humanen Skelettmuskel lässt sich unter in vivo Bedingungen nicht auf lediglich einen Faktor zurückführen, sondern ist selbst im Falle der einfachsten Betrachtungsweise mindestens dichotom – mechanischer und metabolischer Natur. Dennoch kann die Dominanz jeweils einer dieser Komponenten durch eine gezielte Wahl der Belastungsnormative deutlich forciert werden

(vgl. Kap. 2.2.2). Dabei kann davon ausgegangen werden, dass je höher der zu überwindende Widerstand ist, umso stärker die mechanische Stresskomponente zum Tragen kommt. Um zu demonstrieren, dass die mechanische Komponente ein wesentlicher Faktor des durch das Krafttraining induzierten Stresses war, untersuchten wir zusätzlich die Phosphorylierung von JNK. Zuvor wurde die  $p\text{JNK}^{\text{T183/Y185}}$  von zahlreichen Arbeitsgruppen als valider Indikator für mechanischen Stress beschrieben (21, 22, 78, 87, 128), wobei Martineau und Gardener (108) die Phosphorylierung der p54 Variante als in besonderem Maße von der Höhe der induzierten Spannung abhängig zu sein hervorgehoben haben. So konnten wir zeigen, dass zwar die applizierte Krafttrainingsbelastung zu einem deutlichen Anstieg der  $p\text{JNK}^{\text{T183/Y185}}$  und parallel der  $p\text{CRYAB}^{\text{S59}}$  führte, nicht aber eine ausdauerorientierte Belastung auf dem Fahrradergometer.

Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass tatsächlich die mechanische Komponente des kontraktionsinduzierten Stresses im Wesentlichen für die  $p\text{CRYAB}^{\text{S59}}$  verantwortlich ist und nicht kontraktile Aktivität per se.

### 5.3 Methodendiskussion

#### 5.3.1 Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit wurde mit N-Zahlen zwischen sechs und acht Probanden gearbeitet. Grundsätzlich würden jedoch größere Stichproben Folgestudien aufwerten und die statistische *Power* erhöhen. Anders als die Arbeit *in vitro*, bspw. an C2C12 Zellen, birgt die *in vivo* Untersuchung, und speziell die des Menschen, die potenzielle Problematik, dass jedes Individuum eine gewisse Historie der mechanischen Vorkonditionierung mit sich bringt. Diese Variable ist nur schwer kontrollierbar, kann aber unter Beachtung dessen zugunsten einer praxisnahen Situation in Kauf genommen werden. Eine mögliche Alternative wäre lediglich eine vorangehende *Bed Rest*-Situation, die aber einen hochgradigen Aufwand bedeuten würde.

In der ersten Studie (73) wurde der eigentlichen Intervention eine Familiarisationsphase und zudem jedem Termin eines jeweiligen Satzzahlbereiches mit Biopsie ein weiterer Termin gleichen Ablaufs, jedoch ohne Biopsie, vorangestellt [eine Erläuterung zu diesem Vorgehen ist einer dritten, für die vorliegende Arbeit nicht herangezogenen Publikation zu entnehmen (72)]. Obwohl wir zeigen konnten, dass sich die isometrische Maximalkraft vom ersten bis zum letzten Termin nicht veränderte, können wir dennoch nicht ausschließen, dass die vorangegangenen Belastungen einen gewissen Anpassungseffekt gehabt haben könnten. Künftige Studien sollten dies berücksichtigen und alle potenziellen Vorkonditionierungsquellen ausschließen, sofern Effekte einmaliger Belastungen untersucht werden sollen.

In der zweiten Studie konnten zwar Tendenzen, allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der konstant und der progressiv trainierenden Gruppe gezeigt werden. Zwecks statistischer Auswertung wurden daher die Probanden beider Gruppen vereint. Zurückzuführen sind die fehlenden Unterschiede möglicherweise darauf, dass in der progressiven Gruppe die Gewichtssteigerung zu individuell unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen wurde. So konnte es vorkommen, dass manche Probanden am Tag der Biopsie selbst und andere wiederum an den dazwischenliegenden Tagen eine Progression des Trainingsgewichtes erfahren haben. Folglich wäre es für erstere eine mehr oder minder *de novo* Belastung gewesen, für zweitere aber eine mit gewisser Vorkonditionierung. Für künftige Studien, die ein vergleichbares Design verfolgen, wäre es empfehlenswert, die Gewichtssteigerung an einheitlichen Tagen für alle Probanden einer Gruppe vorzunehmen, vorzugsweise am Biopsietag. Dieses Vorgehen würde zwar auf Kosten der von der Studie verfolgten Praxisnähe gehen, ließe aber eine Kontrolle dieser potenziellen Störvariable zu.

Zum Zwecke einer Standardisierung der Belastung wurde in den Interventionen beider Studien ein via Biofeedbacksystem vorgegebenes Kontraktionsmuster eingehalten, von je zwei Sekunden Konzentrik und Exzentrik sowie je einer Sekunde Isometrik in den Umkehrpunkten (ausgenommen das maximal exzentrische Belastungsprotokoll am Isokineten). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses spezifische Kontraktionsmuster auch einen Einfluss auf die Stressinduzierung und damit die beobachtete CRYAB-Regulation hatte. Zum einen bedingt das Kontraktionsmuster die Dauer, die ein Muskel während einer Wiederholung bzw. während eines Satzes aktiv unter Spannung steht (s.g. *time under tension* [TUT]). Folglich hat die TUT unmittelbaren Einfluss auf die Höhe des äußeren Widerstandes, mit dem ein Satz im entsprechenden WM-Bereich absolviert werden kann, wodurch auch die Höhe des mechanischen Stresses determiniert wird. Logischerweise kann mit Verringerung der TUT ein umso höheres Gewicht im entsprechenden WM-Bereich bewegt werden, und andersherum. Es kann daher spekuliert werden, dass eine Reduzierung der TUT und dadurch die Arbeit mit höheren Lasten, möglicherweise auch die Rekrutierung beeinflussen würde (16, 17, 45, 65, 85, 86), was wiederum Einfluss vor allem auf die fasertypspezifische CRYAB-Antwort haben könnte.

### 5.3.2 Analytik

Die Aussagen zur Assoziation von CRYAB mit zytoskelettalen Strukturen wurden anhand qualitativer Begutachtung immunhistologischer Analysen vorgenommen. Zwar ist dies ein übliches und anerkanntes Verfahren, jedoch bestünde die Option einer zusätzlichen (semi-) Quantifizierung, um belastbarere Daten zu generieren. Dies wäre künftig auf Grundlage unseres für die zweite Publikation weiterentwickelten IHC-Auswaschverfahrens durch eine Vermessung der Farbdichte in den Einzelfasern möglich.

In der ersten Studie konnte mittels IHC gezeigt werden, dass im Detergens-unlöslichen Zellpellet, welches sich aus der Zelllyse für die SDS-PAGE bzw. das Western Blotten ergeben hat, noch eine große Menge zytoskelettaler Proteine, sowie daran gebundenes CRYAB befunden hat. Künftig sollte das Pellet einem weiteren Lyseschnitt unterzogen werden, um ein Abbild aller Proteine zu gewährleisten. Dies wäre bspw. mit einem stark denaturierenden Puffer möglich. In der Nachfolgezeit hat sich hierfür ein auf u.a. vier-molarem Urea basierender Puffer als praktikabel erwiesen. Auf der Grundlage solcher Fraktionierungen kann dann die Translokation von Proteinen wie CRYAB in unterschiedliche Kompartimente im Gesamtzelllysat untersucht werden. Zwecks fasertypspezifischer Betrachtung der Translokation/Assoziation von CRYAB (und ggf. auch anderer Proteine), sollte künftig auf den für die Studie zwei modifizierten Analyseansatz zurückgegriffen werden.

Leider wurden in den vorliegenden Studien keine direkten Untersuchungen zu Faser-Rekrutierungsmustern durchgeführt, sodass vor allem die in der ersten Studie (73) getroffenen Aussagen bzgl. fasertypspezifischer CRYAB-Signalantworten auf der Herleitung aus Ergebnissen anderer Studien beruhen. Eine Untermauerung der Aussagen mit Originaldaten wäre hier wünschenswert gewesen.

Grundsätzlich ist auf bio-/histochemischer Ebene eine Ermittlung der Faserrekrutierung mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) metabolitenbasiert wie bspw. anhand des Kreatin- zu Phosphokreatin-Verhältnisses in isolierten und typisierten Fasern, infolge kontraktile Aktivität (16, 17) möglich, oder aber in der Histologie auf Grundlage einer PAS-(*periodic acid Schiff*) Färbung-basierten Bestimmung der Glykogenabnahme in Einzelfasern. Vor allen Dingen ersteres ist ein aufwendiges Verfahren, für das relativ große Gewebemengen notwendig sind. Schlussendlich war in den vorliegenden Studien die zur Verfügung stehende Gewebemenge ein limitierender Faktor. Eine Möglichkeit, dieses Problem in künftigen Studien zu umgehen, könnten Elektromyografie-basierte Methoden zur Abschätzung der Faserrekrutierung bieten.

## 6 Zusammenfassung der Befunde und Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit fasst die Ergebnisse von zwei Studien zusammen, deren Ziel es war, umfassende Erkenntnisse über die Regulation von  $\alpha$ B-Crystallin im humanen Skelettmuskel mithilfe von standardisiertem, kontraktionsinduzierten Stress in einem praxisnahen Setting zu generieren.

Nachfolgend werden die Kernbefunde zunächst in kompakter Form wiedergegeben und abschließend die entsprechenden Schlussfolgerungen daraus gezogen. Zusammenfassend konnten wir Folgendes zeigen:

- Krafttrainingsassoziierte Belastungen führen zu einem starken Anstieg der Phosphorylierung von CRYAB an Serin 59 (73, 74), wofür die mechanische Komponente des kontraktionsinduzierten Stresses wesentlich ist (74).
- Infolge einer wiederholten Applikation gegebener Belastung, bzw. im Rahmen einer mehrwöchigen Trainingsphase, kommt es zu einer sukzessiven Abschwächung der  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort (74). Diese Abschwächung beginnt in Typ II Fasern früher als in Typ I Fasern.
- Wird die regelmäßige Exposition des Muskels gegenüber der Belastung für eine gewisse Zeit ausgesetzt, resultiert eine darauffolgende Belastung in einem Wiederanstieg der  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort (74).
- Die Desminmenge im Skelettmuskel nimmt im Zuge von wiederholter Belastung zu und wieder ab, bei Aussetzung einer Regelmäßigen Stimulation. Das  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Signal und die Desminmenge stehen damit in einer Art inverser Beziehung zueinander.  
Dabei scheint vor allem hoher mechanischer Stress die Desminzunahme zu fördern (74).
- Die  $p$ CRYAB<sup>559</sup>-Antwort ist fasertypspezifisch und abhängig von der Art der Belastung (73). Konkreter bedeutet dies, dass während die  $p$ CRYAB<sup>559</sup> in Typ I Fasern infolge von Belastungen gegen relativ niedrige sowie gegen hohe äußere Widerstände ansteigt, ein Anstieg in Typ II Fasern lediglich infolge von hohen Widerständen zu beobachten ist.
- Grundsätzlich wird CRYAB infolge der Akkumulation eines gewissen Belastungsvolumens (multipler Sätze) phosphoryliert (73). Dabei kann ein erhöhtes Belastungsvolumen die Phosphorylierung von CRYAB in Typ II Fasern begünstigen, auch wenn die reine Intensität (Höhe des äußeren Widerstandes) per se zu gering ist.

Auf der Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse folgern wir:

Die CRYAB-Antwort kann als sensitiver Indikator für myozellulären Stress angesehen werden. Als solcher zeigt sie an, ob bzw. welche Faserentitäten infolge ihrer Exposition gegenüber kontraktionsinduzierten Reizen Stress erfahren haben und lässt zudem Rückschlüsse hinsichtlich einer Zu- sowie Abnahme der myozellulären Stressresistenz zu. Dabei kann eine dynamische Remodellierung des Desminnetzwerkes als Teil der zellulären Strategie vermutet werden, sich an ändernde mechanische Anforderungen anzupassen - insofern, als dass die zytoskelettale Stabilität durch Regulierung der Desmin-Neusynthese und -Degradierung nach Bedarf erhöht oder verringert wird.

Diese Erkenntnisse dienen zum einen dem Verständnis der Funktion des Proteins im Rahmen der Stressabwehrreaktion unter praxisrelevanten *in vivo* Bedingungen. Zum anderen können sie dazu beitragen, zwischen mehr und weniger effektiven Belastungsarten für die Induzierung von akutem Stress sowie chronischer Anpassung von Muskelfasern zu unterscheiden. Dadurch wird im Kontext angewandter Trainingswissenschaft das Wissen um Ursache-Wirkungs-Beziehungen (Belastung - Anpassung) erweitert, was ermöglicht, das Training präziser anhand von physiologischen Beobachtungen im zeitlichen Verlauf zu steuern.

## **7 Ausblick**

Mitunter durch die vorliegende Arbeit ist die intramyozelluläre Regulation von CRYAB zunehmend gut untersucht. Die Bedeutung von CRYAB als extrazellulär bzw. systemisch wirksames Protein ist bislang allerdings noch weit weniger erforscht. Es mehren sich jedoch Studien, die zeigen, dass CRYAB auch extrazellulär eine wichtige Funktion zukommt. Dabei scheint das Molekül außerhalb des zellulären Milieus eine insbesondere immunmodulierende Funktion und damit positive Eigenschaften für neurodegenerative Erkrankungen wie multiple Sklerose zu besitzen (24, 61). So konnte gezeigt werden, dass CRYAB die Funktion eines Negativregulators für entzündliche Prozesse besitzt, indem die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine gehemmt wird (8, 121). Andere Befunde deuten wiederum darauf hin, dass pro-inflammatorische Zytokine durch CRYAB abgefangen und damit neutralisiert werden (138). Weitestgehend Konsens herrscht aber darüber, dass eine exogene Erhöhung von CRYAB im Blutplasma ein mögliches Therapeutikum zur Behandlung o.g. Erkrankungen darstellen könnte (8, 36, 61, 81, 121, 138). Es stellt sich die Frage nach einer Möglichkeit der nichtmedikamentösen systemischen CRYAB-Erhöhung, bspw. durch körperliche Belastung.

Interessant in diesem Kontext sind neueste Befunde, die zeigen, dass CRYAB über einen s.g. unkonventionellen Exozytose-Pfad von Zellen (COS-7) sekretiert werden kann. Und auch hierfür ist die Phosphorylierung an Serin 59 ein entscheidender Faktor (39). Dabei wird CRYAB phosphorylierungsabhängig in das Autophagosom rekrutiert, woraufhin die Interaktion bzw. Fusion

zwischen Autophagosom und Lysosom behindert und jene mit der Plasmamembran begünstigt wird. CRYAB vermag also, das Autophagosom von seinem üblichen Pfad, der zur Proteindegradierung führt, abzubringen, und so aus der Zelle heraus transportiert zu werden. Auch wenn dieser Mechanismus bislang nur *in vitro* gezeigt wurde, so ist das Vorkommen von CRYAB im humanen Blut bereits beschrieben (29, 29, 158) und konnte zudem auch in eigenen Voruntersuchungen festgestellt werden. Vor diesem Hintergrund und der Möglichkeit, die Regulation von CRYAB durch kontraktile Aktivität bewusst in spezifischer Weise zu modulieren, wie unter anderem in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wäre von großem Interesse, ob durch körperliche Belastung die Blutplasmaabundanz von CRYAB verändert bzw. erhöht werden kann. Sollte das der Fall sein, müsste in einem weiteren Schritt geklärt werden, über welchen Weg und woher das CRYAB ins Blut gelangt, bzw. ob der Ursprung tatsächlich die belastete Muskulatur ist. Zudem wäre der Status der posttranslationalen Modifikation von CRYAB im Blut von großem Interesse. Denn selbst ohne substanzielle Veränderungen in seiner Konzentration, könnte eine belastungsbedingte Modifikation des Phosphorylierungszustandes entscheidend sein für Funktion und Aktivität des Proteins, wie dies auch intrazellulär der Fall ist. Final sollte ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der intra- (myozellulär) und extrazellulären Regulation von CRYAB besteht.

Schlussendlich wäre ein solcher Zusammenhang ein wichtiger erster Schritt, der es ermöglichen würde, CRYAB über eine blutbasierte Messung der Verwendung in der angewandten Trainingswissenschaft als Marker zur Trainingssteuerung zugänglich zu machen. Darüber hinaus wären die potenziellen Erkenntnisse von hoher Relevanz für das Verständnis der Zusammenhänge von körperlicher Belastung und damit assoziierter immunmodulatorischer Effekte auf globaler Ebene. Weitergehend könnten die Ergebnisse den Einsatz der Sporttherapie bei Erkrankungen stützen, die mit chronischen Inflammationsprozessen einhergehen, wie dies bspw. bei Multipler Sklerose der Fall ist.



## 8 Literatur

1. Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1),  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44: 1622–1631. doi:10.1016/j.biocel.2012.04.002.
2. Adam A, Luca CJ de. Recruitment order of motor units in human vastus lateralis muscle is maintained during fatiguing contractions. *J Neurophysiol.* 2003; 90: 2919–2927. doi:10.1152/jn.00179.2003.
3. Agarkova I, Schoenauer R, Ehler E, Carlsson L, Carlsson E, Thornell L-E, Perriard J-C. The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur J Cell Biol.* 2004; 83: 193–204. doi:10.1078/0171-9335-00383.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* Sixth edition. Garland Science: New York; 2015.
5. Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008; 88: 287–332. doi:10.1152/physrev.00015.2007.
6. Anderson T, Kearney JT. Effects of three resistance training programs on muscular strength and absolute and relative endurance. *Res Q Exerc Sport.* 1982; 53: 1–7. doi:10.1080/02701367.1982.10605218.
7. Antonioni A, Dimauro I, Fantini C, Barone R, Macaluso F, Di Felice V, Caporossi D.  $\alpha$ B-crystallin response to a pro-oxidant non-cytotoxic environment in murine cardiac cells: An "in vitro" and "in vivo" study. *Free Radic Biol Med.* 2020; 152: 301–312. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.013.
8. Arac A, Brownell SE, Rothbard JB, Chen C, Ko RM, Pereira MP, Albers GW, Steinman L, Steinberg GK. Systemic augmentation of alphaB-crystallin provides therapeutic benefit twelve hours post-stroke onset via immune modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 13287–13292. doi:10.1073/pnas.1107368108.
9. Arrigo A-P, Gibert B. Protein interactomes of three stress inducible small heat shock proteins: HspB1, HspB5 and HspB8. *International Journal of Hyperthermia.* 2013; 29: 409–422. doi:10.3109/02656736.2013.792956.
10. Atomi Y, Yamada S, Nishida T. Early changes of alpha B-crystallin mRNA in rat skeletal muscle to mechanical tension and denervation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1991; 181: 1323–1330.
11. Atomi Y, Yamada S, Strohmamm R, Nonomura Y. Alpha B-crystallin in skeletal muscle: purification and localization. *JOURNAL OF Biochemistry.* 1991; 110: 812–822.
12. Bakthisaran R, Akula KK, Tangirala R, Rao CM. Phosphorylation of  $\alpha$ B-crystallin: Role in stress, aging and patho-physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2016; 1860: 167–182. doi:10.1016/j.bbagen.2015.09.017.
13. Barash IA, Peters D, Fridén J, Lutz GJ, Lieber RL. Desmin cytoskeletal modifications after a bout of eccentric exercise in the rat. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2002; 283.
14. Bawa P, Jones KE. Chapter 19 Do Lengthening Contractions Represent a Case of Reversal in Recruitment Order? In: *Peripheral and Spinal Mechanisms in the Neural Control of Movement.* Elsevier; 1999.

15. Beere HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci.* 2004; 117: 2641–2651. doi:10.1242/jcs.01284.
16. Beltman JGM, Haan A de, Haan H, Gerrits HL, van Mechelen W, Sargeant AJ. Metabolically assessed muscle fibre recruitment in brief isometric contractions at different intensities. *Eur J Appl Physiol.* 2004; 92: 485–492. doi:10.1007/s00421-004-1105-6.
17. Beltman JGM, Sargeant AJ, van Mechelen W, Haan A de. Voluntary activation level and muscle fiber recruitment of human quadriceps during lengthening contractions. *Journal of Applied Physiology.* 2004; 97: 619–626.
18. Bigland-Ritchie B, Woods JJ. Integrated electromyogram and oxygen uptake during positive and negative work. *The Journal of Physiology.* 1976; 260: 267–277. doi:10.1113/jphysiol.1976.sp011515.
19. Bijlsma R, Loeschcke V. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J Evol Biol.* 2005; 18: 744–749. doi:10.1111/j.1420-9101.2005.00962.x.
20. Bonello J-P, Locke M. HSP72 expression is specific to skeletal muscle contraction type. *Cell Stress Chaperones.* 2019; 24: 709–718. doi:10.1007/s12192-019-00997-x.
21. Boppart MD, Aronson D, Gibson L, Roubenoff R, Abad LW, Bean J, Goodyear LJ, Fielding RA. Eccentric exercise markedly increases c-Jun NH2-terminal kinase activity in human skeletal muscle.
22. Boppart MD, Hirshman MF, Sakamoto K, Fielding RA, Goodyear LJ. Static stretch increases c-Jun NH2-terminal kinase activity and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle.
23. Bottinelli R, Reggiani C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2000; 73: 195–262. doi:10.1016/S0079-6107(00)00006-7.
24. Brownell SE, Becker RA, Steinman L. The protective and therapeutic function of small heat shock proteins in neurological diseases. *Front Immunol.* 2012; 3: 74. doi:10.3389/fimmu.2012.00074.
25. Burkholder TJ. Mechanotransduction in skeletal muscle. *Frontiers in Bioscience.* 2008; 12: 174–191.
26. Campos GER, Lucke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagermann FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol.* 2002: 1–25.
27. Caspers GJ, Leunissen JA, Jong WW de. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol.* 1995; 40: 238–248. doi:10.1007/BF00163229.
28. Chalmers GR. Can fast-twitch muscle fibres be selectively recruited during lengthening contractions? Review and applications to sport movements. *Sports Biomech.* 2008; 7: 137–157. doi:10.1080/14763140701683023.
29. Cherneva RV, Georgiev OB, Petrova DS, Trifonova NL, Stamenova M, Ivanova V, Vlasov VI. The role of small heat-shock protein  $\alpha$ B-crystalline (HspB5) in COPD pathogenesis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2012; 7: 633–640. doi:10.2147/COPD.S34929.
30. Choi SJ. Differential susceptibility on myosin heavy chain isoform following eccentric-induced muscle damage. *J Exerc Rehabil.* 2014; 10: 344–348. doi:10.12965/jer.140171.
31. Chrousos GP. The Concepts of Stress and Stress System Disorders. *JAMA.* 1992; 267: 1244. doi:10.1001/jama.1992.03480090092034.

32. Ciano M, Allocca S, Ciardulli MC, Della Volpe L, Bonatti S, D'Agostino M. Differential phosphorylation-based regulation of  $\alpha$ B-crystallin chaperone activity for multipass transmembrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 479: 325–330. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.071.
33. Clements RT, Sodha NR, Feng J, Mieno S, Boodhwani M, Ramlawi B, Bianchi C, Sellke FW. Phosphorylation and translocation of heat shock protein 27 and alphaB-crystallin in human myocardium after cardioplegia and cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 134: 1461–1470. doi:10.1016/j.jtcvs.2007.06.026.
34. Collier MP, Alderson TR, Villiers CP de, Nicholls D, Gastall HY, Allison TM, Degiacomi MT, Fuerst DO, van de Ven PFM, Djinojic-Carugo K, Baldwin AJ, Watkins H, Gehmlich K, Benesch JLP. Phosphorylation of HspB1 regulates its mechanosensitive molecular chaperone interaction with native filamin C; 2018.
35. Collier MP, Benesch JLP. Small heat-shock proteins and their role in mechanical stress. *Cell Stress Chaperones.* 2020; 25: 601–613. doi:10.1007/s12192-020-01095-z.
36. Cubedo J, Vilahur G, Casan L, Mendieta G, Gomez-Jabalera E, Juan-Babot O, Padr T, Badimon L. Targeting the molecular mechanisms of ischemic damage: Protective effects of alpha-crystallin-B. *Int J Cardiol.* 2016; 215: 406–416. doi:10.1016/j.ijcard.2016.04.072.
37. Cumming KT, Ellefsen S, Ronnestad BR, Ugelstad I, Raastad T. Acute and long-term effects of blood flow restricted training on heat shock proteins and endogenous antioxidant systems. *Scand J Med Sci Sports.* 2016; 27: 1190–1201. doi:10.1111/sms.12774.
38. Cumming KT, Paulsen G, Wernbom M, Ugelstad I, Raastad T. Acute response and subcellular movement of HSP27,  $\alpha$  B-crystallin and HSP70 in human skeletal muscle after blood-flow-restricted low-load resistance exercise. *Acta Physiol.* 2014; 211: 634–646. doi:10.1111/apha.12305.
39. D'Agostino M, Scerra G, Cannata Serio M, Caporaso MG, Bonatti S, Renna M. Unconventional secretion of  $\alpha$ -Crystallin B requires the Autophagic pathway and is controlled by phosphorylation of its serine 59 residue. *Sci Rep.* 2019; 9: 16892. doi:10.1038/s41598-019-53226-x.
40. Damas F, Libardi CA, Ugrinowitsch C. The development of skeletal muscle hypertrophy through resistance training: the role of muscle damage and muscle protein synthesis. *Eur J Appl Physiol.* 2018; 118: 485–500. doi:10.1007/s00421-017-3792-9.
41. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 107: 1198–1205. doi:10.1016/s0006-291x(82)80124-1.
42. Dimauro I, Antonioni A, Mercatelli N, Caporossi D. The role of  $\alpha$ B-crystallin in skeletal and cardiac muscle tissues. *Cell Stress Chaperones.* 2018; 23: 491–505. doi:10.1007/s12192-017-0866-x.
43. Dimauro I, Antonioni A, Mercatelli N, Grazioli E, Fantini C, Barone R, Macaluso F, Di Felice V, Caporossi D. The early response of  $\alpha$ B-crystallin to a single bout of aerobic exercise in mouse skeletal muscles depends upon fiber oxidative features. *Redox Biol.* 2019; 24: 101183. doi:10.1016/j.redox.2019.101183.
44. Diokmetzidou A, Soumaka E, Kloukina I, Tsikitis M, Makridakis M, Varela A, Davos CH, Georgopoulos S, Anesti V, Vlahou A, Capetanaki Y. Desmin and  $\alpha$ B-crystallin interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival. *J Cell Sci.* 2016; 129: 3705–3720. doi:10.1242/jcs.192203.
45. Erim Z, Luca CJ de, Mineo K, Aoki T. Rank-ordered regulation of motor units. *Muscle Nerve.* 1996; 19: 563–573. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(199605)19:5<563:AID-MUS3>3.0.CO;2-9.

46. Eyckmans J, Boudou T, Yu X, Chen CS. A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Dev Cell*. 2011; 21: 35–47. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.015.
47. Féasson L, Stockholm D, Freyssenet D, Richard I, Duguez S, Beckmann JS, Denis C. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 2002; 543: 297–306. doi:10.1113/jphysiol.2002.018689.
48. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design*. 1998; 3: R9-R23. doi:10.1016/S1359-0278(98)00002-9.
49. Folkesson M, Mackey AL, Langberg H, Oskarsson E, Piehl-Aulin K, Henriksson J, Kadi F. The expression of heat shock protein in human skeletal muscle: effects of muscle fibre phenotype and training background. *Acta Physiol*. 2013; 209: 26–33. doi:10.1111/apha.12124.
50. Frankenberg NT, Lamb GD, Overgaard K, Murphy RM, Vissing K. Small heat shock proteins translocate to the cytoskeleton in human skeletal muscle following eccentric exercise independently of phosphorylation. *Journal of Applied Physiology*. 2014; 116: 1463–1472. doi:10.1152/jappphysiol.01026.2013.
51. Friden J, Sjöström M, Ekblom B. A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia*. 1981; 37.
52. Friden J, Sjöström M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *International Journal of Sports Medicine*. 1983.
53. Fridén J, Lieber RL. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol Scand*. 2001; 171: 321–326. doi:10.1046/j.1365-201x.2001.00834.x.
54. Galluzzi L, Yamazaki T, Kroemer G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19: 731–745. doi:10.1038/s41580-018-0068-0.
55. Gautel M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23: 39–46. doi:10.1016/j.ceb.2010.12.001.
56. Gjøvaag TF, Dahl HA. Effect of training and detraining on the expression of heat shock proteins in m. triceps brachii of untrained males and females. *Eur J Appl Physiol*. 2006; 98: 310–322. doi:10.1007/s00421-006-0281-y.
57. Golenhofen N, Arbeiter A, Koob R, Drenckhahn D. Ischemia-induced Association of the Stress Protein  $\alpha$  B-crystallin with I-band Portion of Cardiac Titin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2002; 34: 309–319. doi:10.1006/jmcc.2001.1513.
58. Golenhofen N, Ness W, Koob R, Htun P, Schaper W, Drenckhahn D. Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein  $\alpha$  B-crystallin to Z lines of myocardium. 1998.
59. Golenhofen N, Perng MD, Quinlan RA, Drenckhahn D. Comparison of the small heat shock proteins  $\alpha$ B-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and  $\alpha$ cvHSP in heart and skeletal muscle. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122: 415–425. doi:10.1007/s00418-004-0711-z.
60. Goodman CA, Kotecki JA, Jacobs BL, Hornberger TA. Muscle fiber type-dependent differences in the regulation of protein synthesis. *PLoS ONE*. 2012; 7: e37890. doi:10.1371/journal.pone.0037890.
61. Guo Y-S, Liang P-Z, Lu S-Z, Chen R, Yin Y-Q, Zhou J-W. Extracellular  $\alpha$ B-crystallin modulates the inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 508: 282–288. doi:10.1016/j.bbrc.2018.11.024.

62. Haslbeck M, Vierling E. A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis. *Journal of Molecular Biology*. 2015; 427: 1537–1548. doi:10.1016/j.jmb.2015.02.002.
63. Hayashi J, Carver JA. The multifaceted nature of  $\alpha$ B-crystallin. *Cell Stress Chaperones*. 2020; 25: 639–654. doi:10.1007/s12192-020-01098-w.
64. Henderson CA, Christopher G. Gomez, Stefanie M. Novak, Lei Mi-Mi, Carol C. Gregorio. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Comprehensive Physiology*. 2017; 18: 891–944.
65. HENNEMAN E. Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science*. 1957; 126: 1345–1347.
66. Hoffman L, Jensen CC, Yoshigi M, Beckerle M. Mechanical signals activate p38 MAPK pathway-dependent reinforcement of actin via mechanosensitive HspB1. *Molecular Biology of the Cell*. 2017.
67. Horstmann T, Mayer F, Maschmann J, Niess A, Roecker K, Dickhuth HH. Metabolic reaction after concentric and eccentric endurance-exercise of the knee and ankle. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2001; 33: 791–795. doi:10.1097/00005768-200105000-00018.
68. Horwitz J. Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research*. 2003; 76: 145–153. doi:10.1016/S0014-4835(02)00278-6.
69. Hultman E, Bergström J, Anderson NM. Breakdown and resynthesis of phosphorylcreatine and adenosine triphosphate in connection with muscular work in man. *Scand J Clin Lab Invest*. 1967; 19. doi:10.3109/00365516709093481.
70. Ingolia TD, Craig EA. Four small heat shock proteins are related. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982; 79: 2360–2364.
71. Ito H, Okamoto K, Nakayama H, Isobe T, Kato K. Phosphorylation of  $\alpha$ B-Crystallin in Response to Various Types of Stress. *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 29934–29941. doi:10.1074/jbc.272.47.29934.
72. Jacko D, Bersiner K, Friederichs G, Ritter P, Nirenberg L, Eisenbraun J, Marées M de, Bloch W, Gehlert S. Resistance exercise-induced muscle fatigue is not accompanied by increased phosphorylation of ryanodine receptor 1 at serine 2843. *PLoS ONE*. 2018; 13: e0199307. doi:10.1371/journal.pone.0199307.
73. Jacko D, Bersiner K, Hebchen J, de Marees M, Bloch W, Gehlert S. Phosphorylation of  $\alpha$ B-crystallin and its cytoskeleton association differs in skeletal myofiber types depending on resistance exercise intensity and volume. *Journal of Applied Physiology*. 2019.
74. Jacko D, Bersiner K, Schulz O, Przyklenk A, Spahiu F, Höhfeld J, Bloch W, Gehlert S. Coordinated alpha-crystallin B phosphorylation and desmin expression indicate adaptation and deadaptation to resistance exercise-induced loading in human skeletal muscle. *Am J Physiol , Cell Physiol*. 2020; 319: C300-C312. doi:10.1152/ajpcell.00087.2020.
75. Kabakov AE, Gabai VL. Heat shock-induced accumulation of 70-kDa stress protein (HSP70) can protect ATP-depleted tumor cells from necrosis. *Experimental Cell Research*. 1995; 217: 15–21. doi:10.1006/excr.1995.1058.
76. Kathage B, Gehlert S, Ulbricht A, Lüdecke L, Tapia VE, Orfanos Z, Wenzel D, Bloch W, Volkmer R, Fleischmann BK, Fürst DO, Höhfeld J. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim Biophys Acta*. 2017; 1864: 62–75. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.10.007.

77. Kato K, Inaguma Y, Ito H, Iida K, Iwamoto I, Kamei K, Ochi N, Ohta H, Kishikawa M. Ser-59 is the major phosphorylation site in alphaB-crystallin accumulated in the brains of patients with Alexander's disease. *J Neurochem.* 2001; 76: 730–736.
78. Kaunas R, Usami S, Chien S. Regulation of stretch-induced JNK activation by stress fiber orientation. *Cellular Signaling.* 2006; 18: 1924–1931.
79. Khassaf M, Child RB, McArdle A, Brodie DA, Esanu C, Jackson MJ. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *Journal of Applied Physiology.*
80. Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A. Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1991; 88: 3652–3656.
81. Klopstein A, Santos-Nogueira E, Francos-Quijorna I, Redensek A, David S, Navarro X, López-Vales R. Beneficial effects of  $\alpha$ B-crystallin in spinal cord contusion injury. *J Neurosci.* 2012; 32: 14478–14488. doi:10.1523/JNEUROSCI.0923-12.2012.
82. Koh TJ. Do Small Heat Shock Proteins Protect Skeletal Muscle from Injury? *Exerc Sport Sci Rev.* 2002; 30: 117–121. doi:10.1097/00003677-200207000-00005.
83. Koh TJ, Escobedo J. Cytoskeletal disruption and small heat shock protein translocation immediately after lengthening contractions. *AJP: Cell Physiology.* 2004; 286: 713C-722. doi:10.1152/ajpcell.00341.2003.
84. Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeöld A, Fischer I, Paulin D, Schröder R, Wiche G. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol.* 2008; 181: 667–681. doi:10.1083/jcb.200711058.
85. Kopke Vollerstad N, Vaage O, Hermansen L. Muscle glycogen depletion patterns in type I and subgroups of type II fibres during prolonged severe exercise in man: Glycogen depletion in muscle fibres during exercise. *Acta Physiol Scand.* 1984; 122: 433–441.
86. Krstrup P, Söderlund K, Mohr M, González-Alonso J, Bangsbo J. Recruitment of fibre types and quadriceps muscle portions during repeated, intense knee-extensor exercise in humans. *Pflugers Arch.* 2004; 449: 56–65. doi:10.1007/s00424-004-1304-3.
87. Kumar A, Chaudhry I, Reid MB, Boriek AM. Distinct signaling pathways are activated in response to mechanical stress applied axially and transversely to skeletal muscle fibers. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002; 277: 46493–46503. doi:10.1074/jbc.M203654200.
88. Lapidus LJ. Protein unfolding mechanisms and their effects on folding experiments. *F1000Res.* 2017; 6: 1723. doi:10.12688/f1000research.12070.1.
89. Larkins NT, Murphy RM, Lamb GD. Absolute amounts and diffusibility of HSP72, HSP25, and  $\alpha$ B-crystallin in fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers of rat. *Am J Physiol , Cell Physiol.* 2012; 302: C228-39. doi:10.1152/ajpcell.00266.2011.
90. Larkins NT, Murphy RM, Lamb GD. Influences of temperature, oxidative stress, and phosphorylation on binding of heat shock proteins in skeletal muscle fibers. *Am J Physiol , Cell Physiol.* 2012; 303: C654-65. doi:10.1152/ajpcell.00180.2012.
91. Larkins NT, Murphy RM, Lamb GD. Influences of temperature, oxidative stress, and phosphorylation on binding of heat shock proteins in skeletal muscle fibers. *Am J Physiol , Cell Physiol.* 2012; 303: C654-65. doi:10.1152/ajpcell.00180.2012.

92. Launay N, Goudeau B, Kato K, Vicart P, Lillienbaum A. Cell signaling pathways to alphaB-crystallin following stresses of the cytoskeleton. *Experimental Cell Research*. 2006; 312: 3570–3584.  
doi:10.1016/j.yexcr.2006.07.025.
93. Li Z, Colucci-Guyon E, Pinçon-Raymond M, Mericskay M, Pournin S, Paulin D, Babinet C. Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Dev Biol*. 1996; 175: 362–366.  
doi:10.1006/dbio.1996.0122.
94. Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Brownie G, Carlsson L, Thornell L-E, Babinet C, Paulin D. Desmin Is Essential for the Tensile Strength and Integrity of Myofibrils but Not for Myogenic Commitment, Differentiation, and Fusion of Skeletal Muscle. *J Cell Biol*. 1997; 139: 129–144.
95. Lieber RL, Friden J. Selective damage of fast glycolytic muscle fibres with eccentric contraction of the rabbit tibialis anterior. *Acta Physiol Scand*. 1988; 133: 587–588.
96. Lieber RL, Thornell L-E, Friden J. Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. *Journal of Applied Physiology*. 1996; 80.
97. Lieber RL, Woodburn TM, Fridén J. Muscle damage induced by eccentric contractions of 25% strain. *J Appl Physiol*. 1991; 70: 2498–2507. doi:10.1152/jappl.1991.70.6.2498.
98. Lindquist S. The Heat-Shock Response. *Annual Reviews of Biochemistry*. 1986; 55: 1151–1191.
99. Linnamo V, Moritani T, Nicol C, Komi PV. Motor unit activation patterns during isometric, concentric and eccentric actions at different force levels. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2003; 13: 93–101.  
doi:10.1016/S1050-6411(02)00063-9.
100. Liu Y, Gampert L, Nething K, Steinacker JM. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Front Biosci*. 2006; 11: 2802–2827. doi:10.2741/2011.
101. Liu Y, Lormes W, Baur C, Opitz-Gress A, Altenburg D, Lehmann M, Steinacker JM. Human skeletal muscle HSP70 response to physical training depends on exercise intensity. *International Journal of Sports Medicine*. 2000; 21: 351–355. doi:10.1055/s-2000-3784.
102. Liu Y, Lormes W, Wang L, Reissnecker S, Steinacker JM. Different skeletal muscle HSP70 responses to high-intensity strength training and low-intensity endurance training. *Eur J Appl Physiol*. 2004; 91: 330–335.  
doi:10.1007/s00421-003-0976-2.
103. Luca CJ de, Contessa P. Hierarchical control of motor units in voluntary contractions. *J Neurophysiol*. 2012; 107: 178–195. doi:10.1152/jn.00961.2010.
104. Macaluso F, Isaacs AW, Myburgh KH. Preferential type II muscle fiber damage from plyometric exercise. *Journal of Athletic Training*. 2012; 47: 414–420. doi:10.4085/1062-6050-47.4.13.
105. Macpherson PCD, Schork AM, Faulkner JA. Contraction-induced injury to single fiber segments from fast and slow muscles of rats by single stretches. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996; 271.
106. Maio A de, Santoro MG, Tanguay RM, Hightower LE. Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones*. 2012; 17: 139–143. doi:10.1007/s12192-012-0320-z.
107. Mao Z, Nakamura F. Structure and Function of Filamin C in the Muscle Z-Disc. *Int J Mol Sci*. 2020; 21.  
doi:10.3390/ijms21082696.

108. Martineau LC, Gardiner PF. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. *Journal of Applied Physiology*. 2001; 91: 693–702. doi:10.1152/jappl.2001.91.2.693.
109. Meyer GA, Kiss B, Ward SR, Morgan DL, Kellermayer MSZ, Lieber RL. Theoretical predictions of the effects of force transmission by desmin on intersarcomere dynamics. *Biophys J*. 2010; 98: 258–266. doi:10.1016/j.bpj.2009.10.014.
110. Mikkelsen UR, Paulsen G, Schjerling P, Helmark IC, Langberg H, Kjær M, Heinemeier KM. The heat shock protein response following eccentric exercise in human skeletal muscle is unaffected by local NSAID infusion. *Eur J Appl Physiol*. 2013; 113: 1883–1893. doi:10.1007/s00421-013-2606-y.
111. Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol*. 1996; 134: 1255–1270. doi:10.1083/jcb.134.5.1255.
112. Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Durst B. The Exercise-Induced Stress Response of Skeletal Muscle, with Specific Emphasis on Humans. *Sports Medicine*. 2009.
113. Morton JP, MACLAREN DP, Cable NT, Bongers T, Griffiths RD, Campbell IT, Evans L, Kayani AC, McArdle A, Durst B. Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2006; 101: 176–182. doi:10.1152/jappphysiol.00046.2006.
114. Morton JP, MacLaren, D. P. M., Cable NT, Campbell IT, Evans L, Bongers T, Griffiths RD, Kayani AC, McArdle A, Durst B. Elevated core and muscle temperature to levels comparable to exercise do not increase heat shock protein content of skeletal muscle of physically active men. *Acta Physiol*. 2007; 190: 319–327. doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01711.x.
115. Morton RW, Sonne MW, Farias Zuniga A, Mohammad IYZ, Jones A, McGlory C, Keir PJ, Potvin JR, Phillips SM. Muscle fibre activation is unaffected by load and repetition duration when resistance exercise is performed to task failure. *The Journal of Physiology*. 2019; 597: 4601–4613. doi:10.1113/JP278056.
116. Muranova LK, Sudnitsyna MV, Gusev NB.  $\alpha$ B-Crystallin Phosphorylation: Advances and Problems. *Biochemistry Mosc*. 2018; 83: 1196–1206. doi:10.1134/S000629791810005X.
117. Nardone A, Romanò C, Schieppati M. Selective recruitment of high-threshold human motor units during voluntary isotonic lengthening of active muscles. *The Journal of Physiology*. 1989; 409: 451–471. doi:10.1113/jphysiol.1989.sp017507.
118. Nardone A, Schieppati M. Shift of activity from slow to fast muscle during voluntary lengthening contractions of the triceps surae muscles in humans. *Journal of Physiology*. 1988; 395: 363–381.
119. Noble EG, Milne KJ, Melling CWJ. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008; 33: 1050–1065. doi:10.1139/H08-069.
120. Ogasawara R, Fujita S, Hornberger TA, Kitaoka Y, Makanae Y, Nakazato K, Naokata I. The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. *Sci Rep*. 2016; 6: 31142. doi:10.1038/srep31142.
121. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, Sobel RA, Robinson WH, Steinman L. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*. 2007; 448: 474–479. doi:10.1038/nature05935.



122. Parcell AC, Woolstenhulme MT, Sawyer RD. STRUCTURAL PROTEIN ALTERATIONS TO RESISTANCE AND ENDURANCE CYCLING EXERCISE TRAINING. *J Strength Cond Res.* 2009; 23: 359–365.
123. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research.* 2004; 301: 1–7. doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.004.
124. Paulsen G, Hanssen KE, Rønnestad BR, Kvamme NH, Ugelstad I, Kadi F, Raastad T. Strength training elevates HSP27, HSP70 and  $\alpha$ B-crystallin levels in musculus vastus lateralis and trapezius. *Eur J Appl Physiol.* 2012; 112: 1773–1782. doi:10.1007/s00421-011-2132-8.
125. Paulsen G, Lauritzen F, Bayer ML, Kalthovde JM, Ugelstad I, Owe SG, Hallen J, Bergersen LH, Raastad T. Subcellular movement and expression of HSP27, B-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *Journal of Applied Physiology.* 2009; 107: 570–582. doi:10.1152/jappphysiol.00209.2009.
126. Paulsen G, Vissing K, Kalthovde JM, Ugelstad I, Bayer ML, Kadi F, Schjerling P, Hallen J, Raastad T. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2007; 293: R844–R853. doi:10.1152/ajpregu.00677.2006.
127. Peñailillo L, Blazevich A, Numazawa H, Nosaka K. Metabolic and muscle damage profiles of concentric versus repeated eccentric cycling. *Med Sci Sports Exerc.* 2013; 45: 1773–1781. doi:10.1249/MSS.0b013e31828f8a73.
128. Pereira AM, Tudor C, Kanger JS, Subramaniam V, Martin-Blanco E. Integrin-dependent activation of the JNK signaling pathway by mechanical stress. *PLoS ONE.* 2011; 6: e26182. doi:10.1371/journal.pone.0026182.
129. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev.* 2008; 88: 1243–1276. doi:10.1152/physrev.00031.2007.
130. Prado LG, Makarenko I, Andresen C, Krüger M, Opitz CA, Linke WA. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol.* 2005; 126: 461–480. doi:10.1085/jgp.200509364.
131. Qaisar R, Bhaskaran S, van Remmen H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med.* 2016; 98: 56–67. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025.
132. Rafiee P, Theriot ME, Nelson VM, Heidemann J, Kanaa Y, Horowitz SA, Rogaczewski A, Johnson CP, Ali I, Shaker R, Binion DG. Human esophageal microvascular endothelial cells respond to acidic pH stress by PI3K/AKT and p38 MAPK-regulated induction of Hsp70 and Hsp27. *Am J Physiol , Cell Physiol.* 2006; 291: C931–45. doi:10.1152/ajpcell.00474.2005.
133. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia.* 1962; 18: 571–573. doi:10.1007/BF02172188.
134. Robergs RA, Ghasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2004; 287: R502–R516. doi:10.1152/ajpregu.00114.2004.
135. Rognoni L, Stigler J, Pelz B, Ylännä J, Rief M. Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 19679–19684. doi:10.1073/pnas.1211274109.

136. Rognoni L, Stigler J, Pelz B, Ylänne J, Rief M. Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 19679–19684. doi:10.1073/pnas.1211274109.
137. Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Tracy BL, Hurblut DE, Metter EF, Hurley BF, Rogers MA. Ultrastructural muscle damage in young vs. older men after high-volume, heavy-resistance strength training. *Journal of Applied Physiology*. 1999.
138. Rothbard JB, Kurnellas MP, Brownell S, Adams CM, Su L, Axtell RC, Chen R, Fathman CG, Robinson WH, Steinman L. Therapeutic effects of systemic administration of chaperone  $\alpha$ B-crystallin associated with binding proinflammatory plasma proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287: 9708–9721. doi:10.1074/jbc.M111.337691.
139. Sangid MD. The physics of fatigue crack initiation. *International Journal of Fatigue*. 2013; 57: 58–72. doi:10.1016/j.ijfatigue.2012.10.009.
140. Schaedel L, John K, Gaillard J, Nachury MV, Blanchoin L, Théry M. Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat Mater*. 2015; 14: 1156–1163. doi:10.1038/nmat4396.
141. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011; 91: 1447–1531. doi:10.1152/physrev.00031.2010.
142. Schmidt T, Bartelt-Kirbach B, Golenhofen N. Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/ $\alpha$ B-crystallin in cultured hippocampal neurons. *Histochem Cell Biol*. 2012; 138: 407–418. doi:10.1007/s00418-012-0964-x.
143. Schoenfeld BJ. Potential Mechanisms for a Role of Metabolic Stress in Hypertrophic Adaptations to Resistance Training. *Sports Med*. 2013; 43: 179–194. doi:10.1007/s40279-013-0017-1.
144. Sharma S, Conover GM, Elliott JL, Der Perng M, Herrmann H, Quinlan RA.  $\alpha$ B-crystallin is a sensor for assembly intermediates and for the subunit topology of desmin intermediate filaments. *Cell Stress Chaperones*. 2017; 22: 613–626. doi:10.1007/s12192-017-0788-7.
145. Singh BN, Rao KS, Ramakrishna T, Rangaraj N, Rao CM. Association of  $\alpha$ B-crystallin, a small heat shock protein, with actin: Role in modulating actin filament dynamics in vivo. *Journal of Molecular Biology*. 2007; 366: 756–767. doi:10.1016/j.jmb.2006.12.012.
146. Snijders T, Smeets JSJ, van Kranenburg J, Kies AK, van Loon LJC, Verdijk LB. Changes in myonuclear domain size do not precede muscle hypertrophy during prolonged resistance-type exercise training. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2016; 216: 231–239. doi:10.1111/apha.12609.
147. T. W. Ryschon, M. D. Fowler, R. E. Wysong, A.-R. Anthony, and R. S. Balaban. Efficiency of human skeletal muscle in vivo: comparison of isometric, concentric, and eccentric muscle action.
148. Tang S, Chen H, Cheng Y, Nasir MA, Kemper N, Bao E. Expression profiles of heat shock protein 27 and  $\alpha$ B-crystallin and their effects on heat-stressed rat myocardial cells in vitro and in vivo. *Mol Med Rep*. 2016; 13: 1633–1638. doi:10.3892/mmr.2015.4693.
149. Tannerstedt J, Apró W, Blomstrand E. Maximal lengthening contractions induce different signaling responses in the type I and type II fibers of human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2009; 106: 1412–1418. doi:10.1152/jappphysiol.91243.2008.
150. Tesh PA, Colliander EB, Kaiser P. Muscle metabolism during intense, heavy-resistance exercise. *Eur J Appl Physiol*. 1986; 55.

151. Thorstensson A, Grimby G, Karlsson J. Force-velocity relations and fiber composition in human knee extensor muscles. *Journal of Applied Physiology*. 1976; 40.
152. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*. 1974; 84: 389–398. doi:10.1016/0022-2836(74)90447-1.
153. Toigo M, Boutellier U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *Eur J Appl Physiol*. 2006; 97: 643–663. doi:10.1007/s00421-006-0238-1.
154. Trappe S, Luden N, Minchev K, Raue U, Jemiolo B, Trappe TA. Skeletal muscle signature of a champion sprint runner. *J Appl Physiol*. 2015; 118: 1460–1466. doi:10.1152/jappphysiol.00037.2015.
155. Ulbricht A, Eppler FJ, Tapia VE, van der Ven PFM, Hampe N, Hersch N, Vakeel P, Stadel D, Haas A, Saftig P, Behrends C, Fürst DO, Volkmer R, Hoffmann B, Kolanus W, Höhfeld J. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr Biol*. 2013; 23: 430–435. doi:10.1016/j.cub.2013.01.064.
156. Ulbricht A, Gehlert S, Leciejewski B, Schiffer T, Bloch W, Höhfeld J. Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy*. 2015; 11: 538–546. doi:10.1080/15548627.2015.1017186.
157. van den IJssel PR, Overkamp P, Bloemendal H, Jong WW de. Phosphorylation of alphaB-crystallin and HSP27 is induced by similar stressors in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 247: 518–523. doi:10.1006/bbrc.1998.8699.
158. van Noort JM, Bsibsi M, Nacken PJ, Verbeek R, Venneker EHG. Therapeutic Intervention in Multiple Sclerosis with Alpha B-Crystallin: A Randomized Controlled Phase IIa Trial. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0143366. doi:10.1371/journal.pone.0143366.
159. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prévost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tomé F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature genetics*. 1998; 20: 92–95. doi:10.1038/1765.
160. Vijayan K, Thompson JL, Norenberg KM, Fitts RH, Riley DA. Fiber-type susceptibility to eccentric contraction-induced damage of hindlimb-unloaded rat AL muscles. *Journal of Applied Physiology*. 2001; 90: 770–776. doi:10.1152/jappl.2001.90.3.770.
161. Vissing K, Bayer ML, Overgaard K, Schjerling P, Raastad T. Heat shock protein translocation and expression response is attenuated in response to repeated eccentric exercise. *Acta Physiologica*. 2009; 196: 283–293. doi:10.1111/j.1748-1716.2008.01940.x.
162. Wang X, Klevitsky R, Huang W, Glasford J, Li F, Robbins J. AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circulation Research*. 2003; 93: 998–1005. doi:10.1161/01.RES.0000102401.77712.ED.
163. Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006; 174: 801–809. doi:10.1503/cmaj.051351.
164. Warren GL, Hayes DA, Lowe DA, Prior BM, Armstrong RB. MATERIALS FATIGUE INITIATES ECCENTRIC CONTRACTION INDUCED INJURY IN RAT SOLEUS MUSCLE. *Journal of Physiology*. 1993; 464: 477–489.

165. Woolstenhulme MT, Conlee RK, Drummond MJ, Stites AW, Parcell AC. Temporal response of desmin and dystrophin proteins to progressive resistance exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 1876–1882. doi:10.1152/jappphysiol.01592.2005.
166. Woolstenhulme MT, Jutte LS, Drummond MJ, Parcell AC. Desmin increases with high-intensity concentric contractions in humans. *Muscle Nerve.* 2005; 31: 20–24. doi:10.1002/mus.20170.
167. Yamamoto DL, Csikasz RI, Li Y, Sharma G, Hjort K, Karlsson R, Bengtsson T. Myotube formation on micro-patterned glass: intracellular organization and protein distribution in C2C12 skeletal muscle cells. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56: 881–892. doi:10.1369/jhc.2008.951228.
168. Yu J-G, Thornell L-E. Desmin and actin alterations in human muscles affected by delayed onset muscle soreness: A high resolution immunocytochemical study. *Histochem Cell Biol.* 2002; 118: 171–179. doi:10.1007/s00418-002-0427-x.
169. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research.* 2005; 15.