

**Vilde Handegard**

**Nativ myse kontra lettmjølk: effekt av 12 veker  
regelbunden styrketrening og proteintilskot på anabol  
signalering**

Ei dobbel-blinda, randomisert og kontrollert studie

**Masteroppgave i idrettsvitenskap**

Seksjon for fysisk prestasjonsevne  
Norges idrettshøgskole, 2016



## **Samandrag**

**INTRODUKSJON:** Inntak av mjølkeprotein kan stimulera myofibrillær proteinsyntese (MPS) etter ei styrketreningsøkt. Auka MPS er eit resultat av auka aktivitet i anabole signalvegar, med markørar som bl.a. fosforylering av p70S6k (p-p70S6k). Aminosyra leucin har blitt sett på som ein potent triggar av MPS. Derfor har det blitt antatt at proteinkjelder som gir ein rask auke i [leucin] i blod kan vera fordelaktig for muskulære adaptasjonar til styrketreningsøkt. Målet med denne masteroppgåva var å undersøka om supplementering med nativ myse (100% myseprotein), som gir ein rask auke i [leucin] i blod, stimulera aktivitetten i anabole signalvegar i større grad enn mjølkeprotein (20% myseprotein, 80% kaseinar), og om dette fører til større muskelvekst og auke i styrke etter 12 veker med styrketrening og protein-supplementering.

**METODE:** 22 menn og kvinner ( $30 \pm 6$  år) vart randomisert til å innta anten mjølk eller nativ myse. Begge gruppene gjennomførte tung styrketrening i 12 veker (tre økter per veke). Protein vart gitt direkte etter kvar økt, i tillegg til morgen eller kveld (2 x 20g kvar dag). Muskelbiopsiar vart teke 30 minutt før og to timer etter første og siste treningsøkt, og vart analysert for hypertrofisignalering og fiberareal. Muskelstyrke i beinpress og tjukn og tverrsnitt av m. vastus lateralis vart målt før og etter treningsintervensjonen.

**RESULTAT:** P-p70S6k auka signifikant frå før til etter første treningsøkt for nativ myse-gruppa og nativ myse viste signifikant større fosforylering enn mjøkegruppa. Etter siste treningsøkt var det ingen signifikante forskjellar mellom gruppene i p-p70S6k, begge auka frå før til etter treningsøkta. Det var ingen endringar i p-eEF2, medan 4E-BP1 auka akutt etter siste treningsøkt i begge gruppene. Begge gruppene auka signifikant muskelstyrke i beinpress, i tillegg til auka tverrsnitt og tjukn i m. vastus lateralis, men det var ingen forskjellar mellom gruppene.

**KONKLUSJON:** I samsvar med hypotesen vår auka p-p70S6k signifikant meir i nativ myse-gruppa samanlikna med mjøkegruppa etter første treningsøkt. Denne forskjellen var derimot ikkje observert etter siste treningsøkt og det har truleg skjedd ein adaptasjon i signaleringsmønsteret i løpet av treningsintervensjonen. I tillegg viser den manglande forskjellen mellom supplementgruppene i muskelstyrke og -størrelse etter intervensjonen at den auka anabole signaleringa i nativ myse-gruppa ved første treningsøkt ikkje ført til større adaptasjonar i skelettmuskulaturen.

## Forord

Denne oppgåva har kravd mykje hardt arbeid, lange dagar på laboratoriet og kontoret, augneblink av fortviling og ynskjer om å kasta heile macbooken i veggen. Til tross for dette, har det og vore utruleg lærerikt og veldig moro. Eg angra ikkje eit halvt sekund.

Takk til mine to rettleiarar Truls og Håvard for tilliten eg har fått (tenk om eg hadde pipetert buffer III i membranfraksjonen!). Takk for gode samtalar, rettingar og gjennomlesingar av oppgåva, den har definitivt ikkje skrive seg sjølv. Dekans gode forslag, tankar og idear har løfta oppgåva.

Arbeid med behandling og analysar av muskelbiopsiar har vore utfordrande og veldig spennande. All opplæring og hjelp av Ingrid, Hege og Sigve har vore uvurderleg – Takk! Deko er dyktige og tolmodige.

Takk til alle forsøkspersonane som stilte opp, drakk protein, trena hardt og gav oss muskelvev.

Ein spesiell takk til Camilla, Hege Pernille, Ingvar, Sven, Jostein, Jørgen, Steffen og Herman. Deko har gjort dagane på laben og kontoret til ein fest! Lura på om Truls har fått med seg alle dei interessante diskusjonane gjennom veggen?

Takk til Lea for grundig korrekturlesing og humor av ypparste klasse.

Espen, tusen takk for at du har vore der for meg. Eg har alltid gledd meg til å koma heim til deg. Alt ser litt lysare ut gjennom dine auge.

Kjære mamma, pappa, Ida og Runar – den beste flokken. Takk for all støtte alltid.

Oslo, mai 2016

*Vilde Handegard*

## Innhaldsliste

<b>Samandrag .....</b>	<b>3</b>
<b>Forord .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Innleiing .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Teori .....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Muskelproteinbalanse: eit reknestykke .....	10
2.1.2 Akutt effekt av styrketrening på muskelproteinbalansen .....	10
2.2 <i>Proteinets funksjonar i kroppen</i> .....	11
2.2.1 Aminosyrer og essensielle aminosyrer .....	11
2.2.2 "Leucin-trigger"-hypotesen .....	12
2.3 <i>Proteininntak og styrketrening</i> .....	13
2.3.1 Akutte effektar av styrketrening og proteininntak .....	13
2.3.2 Longitudinelle effektar av regelbunden proteininntak og styrketrening .....	14
2.3.3 Distribusjon av proteininntak .....	16
2.3.4 Proteininntak: Mengde.....	16
2.3.5 Proteinkjelder .....	18
2.3.6 Behandling av mjølkeproteinfraksjonar .....	20
2.3.7 Oppsummering .....	20
2.4 <i>Intracellulær signalering</i> .....	20
2.4.1 mTOR .....	22
2.4.2 p70S6k .....	23
2.4.3 4E-BP1.....	26
2.4.4 eEF2 .....	27
2.4.5 Oversiktstabell.....	30
2.5 <i>Oppsummering</i> .....	31
<b>3. Metode .....</b>	<b>32</b>
3.1 <i>Forsøkspersonar</i> .....	32
3.2 <i>Treningsintervensjonen</i> .....	33
3.3 <i>Ernæring</i> .....	33
3.4 <i>Akuttforsøk</i> .....	35
3.5 <i>Målingar</i> .....	36
3.5.1 Maksimal volontør kontraksjon (MVC) og 1RM-tester .....	36
3.5.2 Muskelbiopsiar .....	36

3.5.3 Andre målingar .....	36
<b>3.6 Analysar .....</b>	<b>37</b>
3.6.1 Homogenisering .....	37
3.6.2 Proteinmåling .....	37
3.6.3 Western Blot.....	37
<b>3.7 Statistikk .....</b>	<b>41</b>
<b>4. Resultat.....</b>	<b>42</b>
4.1 Leucinkonsentrasjon i blod/plasma.....	42
4.2 Intracellulær signalering.....	43
4.2.1 p70S6K .....	43
4.2.2 4E-BP1.....	44
4.2.3 eEF2 .....	44
4.3 Total protein .....	45
4.4 Korrelasjoner .....	45
4.5 Muskelstyrke (1RM).....	46
4.6 Hypertrofi i m. Vastus Lateralis .....	47
<b>5. Diskusjon .....</b>	<b>48</b>
5.1 Leucinkonsentrasjon og intracellulær signalering .....	48
5.1.1 Status: utrent.....	48
5.1.2 Status: trena .....	53
5.2 Ratio mellom signalprotein og total protein .....	55
5.3 Effekt på muskelvekst.....	55
5.4 Muskelstyrke (1RM).....	56
5.5 Kan anabol signalering predikera MPS og hypertrofi?.....	57
<b>6. Konklusjon .....</b>	<b>61</b>
<b>Kjelder .....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelloversikt.....</b>	<b>71</b>
<b>Figuroversikt .....</b>	<b>72</b>
<b>Forkortinger .....</b>	<b>74</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>76</b>

## **1. Innleiing**

Muskelmassen er sentral i utføring av alle typar bevegelsar og er derfor heilt avgjerande for daglegdagsfunksjon, i tillegg til idrettsleg prestasjon. Skjelettmuskulaturen er ikkje berre avgjerande for funksjon, men spelar òg ei viktig rolle i reduksjon av risiko for utvikling av forskjellige livsstilssjukdommar som hjarte- og karsjukdommar, fedme og diabetes (Wolfe, 2006). Skjelettmuskulaturen er i stor grad plastisk og kan adaptera til ulike stimuli, deriblant styrketrening og næringsinntak. Endringar i muskelproteinsyntese og –nedbryting fører til remodellering av muskelmassen (Witard, Wardle, Macnaughton, Hodgson, & Tipton, 2016) som er nødvendig for å oppnå hypertrofi.

Det er utført ei rekke studiar som har studert effekt av forskjellige treningsregimer for å indusera størst mogleg muskelvekst, og det er stor einigkeit i korleis ein bør trena for å verte sterkest, størst og mest spenstig/hurtig (Kraemer et al., 2002). I tillegg har næringsinntak blitt studert nøyne og også her er det konsensus rundt kva som er optimalt dagleg proteininntak for ulike grupper og kva proteinkjelder som er dei beste (Devries & Phillips, 2015; Perez-Schindler, Hamilton, Moore, Baar, & Philp, 2015; Witard et al., 2016). Øg kombinasjonen av styrketrening og proteininntak har blitt studert i fleire studiar (Biolo, Tipton, Klein, & Wolfe, 1997; Camera et al., 2015; Churchward-Venne, Burd, & Phillips, 2012a; Moore, Tang, et al., 2009b; Witard et al., 2014). Ved å kombinera styrketrening og optimalt proteininntak veit me at skjelettmuskulaturen veks. Altså er effekt av trening og proteininntak godt kartlagt, men kva med intermediatane – signaleringa som fører til auka proteinsyntese, som igjen fører til hypertrofi? Dei viktigaste komponentane i gode proteinkjelder som stimulerer anabol signalering og deretter proteinsyntesen ser ut til å vera protein som vert raskt fordøya (som fører til rask tilgjengeleghet av aminosyrer (AA)) og har eit høgt innhald av essensielle aminosyrer (EAA) og forgreina aminosyrer (FAA), spesielt leucin (Devries & Phillips, 2015).

Det har blitt framsett ei hypotese om at auka leucinkonsentrasjon i blod i etterkant av ei styrketreningsøkt vil stimulera til ytterlegare auke i proteinsyntese (Burd, Tang, Moore, & Phillips, 2009; Tang, Moore, Kujbida, Tarnopolsky, & Phillips, 2009). Bakgrunnen for denne hypotesen var ei samanlikning av myse-, kasein- og soyaproteininntak etter ei

treningsøkt, kor myse viste ei signifikant auke i [leucin] i blod samanlikna med dei to andre proteinsupplementa 30 minutt etter inntak. Dette vart òg reflektert i ein signifikant større respons i proteinsyntese hjå mysegruppa (Tang et al., 2009). Nyleg har det blitt vist at ved å tilføra ekstra leucin til ein protein- og karbohydratblanding auka MPS ytterlegare samanlikna med same blandinga pluss alanin i staden for leucin (Atherton et al., 2016) Dette kan tyda på at proteinsupplement med stor del leucin og som er raskt fordøyeleg (som dermed fører til stor auke i [leucin] i blod) vil vera fordelaktig å konsumera for å oppnå størst effekt av styrketrening. Det vil derfor vera interessant å studera akutt effekt av to ulike proteinsupplement med ulik mengde leucin og fordøyingshastigkeit før og etter ein trenings- og suppleringsintervensjon for å sjå på endringar over tid.

Studiane som har undersøkt anabol signalering i samband med styrketrening og proteininntak er som regel akuttstudiar, og fortel oss lite om anna enn det som skjer akkurat der og då. I tillegg er studiane ofte gjort i laboratorium, på utrente, i faste. Dette er forhold som vil påverka resultata og vil ikkje nødvendigvis reflektera det ein vil finna i ein meir naturleg setting, kor mange til dømes et frukost og gjerne lunsj før ei treningsøkt.

Målet med denne masteroppgåva var å studera endringar i anabol signalering ved supplerering med nativ myse (2,35g leucin/dose) eller lettmjølk (1,97g leucin/dose) etter ei akutt treningsøkt hjå yngre, før og etter ein 12-vekers treningsperiode og samanlikna gruppene. På bakgrunn av dette har det blitt fastsett følgjande hypotesar:

*Hypotese nr. 1:* det vil vera auka aktivitet i anabole signalvegar etter éi styrketreningsøkt ved inntak av nativ myse samanlikna med lettmjølk

*Hypotese nr. 2:* det vil vera lågare aktivitet i anabole signalvegar etter éi styrketreningsøkt som fylge av 12 vekers treningsperiode samanlikna med før treningsperioden.

*Hypotese nr. 3:* det vil vera større endringar i muskelmasse og -styrke hjå nativ mysegruppa samanlikna med lettmjølk-gruppa etter 12 veker med regelbunden styrketrening og proteinsupplerering.

## **2. Teori**

Skjelettmuskulaturen er, som namnet tilseier, festa til knoklane i menneskekroppen. Det er skjelettmuskulaturen som utfører all viljestyrt rørsle av skjelettet, og er derfor uunnverleg for menneskeleg aktivitet (Widmaier, Raff & Strang, 2014). Proteina er byggsteinane i kroppen, og er heilt essensielle for oppbygging av alle typar vev, deriblant muskelvev. Når muskelvev skal veksa, er det behov for nydanning av protein og dermed aukar hastigheita på proteinsyntesen. Det er fleire stimuli som kan føra til auka proteinsyntese, som styrketrening og proteininntak. Auka størrelse på myofibrillane i skjelettmuskulaturen, hypertrofi, er ein effekt av auka proteinsyntese, redusert nedbryting eller kombinasjon av begge, over tid (Widmaier et al., 2014). Hypertrofi som fylgle av mekanisk belastning er komplekst, der mange forskjellige prosessar føregår samstundes: signalering initiert av mekanosensorar, metabolsk (over)belastning, signalering mediert av kalsium med fleire (Adams & Bamman, 2012).

Ettersom endring i muskelmasse er eit resultat av opp- eller nedjustert proteinsyntese og –nedbryting over tid, hadde det vore interessant om responsen i MPS etter ei akutt styrketreningsøkt reflekterte auken i muskelmasse etter ein periode med regelbunden styrketrening. Likevel ser det ut til at resultat frå akutt-studiar ikkje nødvendigvis gjenspeglar den observerte muskelvekst etter ein treningsperiode på for eksempel 12 veker (Adams & Bamman, 2012) som vist i fleire studiar (Mayhew, Kim, Cross, Ferrando, & Bamman, 2009; C. J. Mitchell et al., 2014). Det tyder på at personar som har lav akutt respons på styrketrening (MPS), kan likevel ha potensiale for hypertrofi.

Inntak av protein i samband med styrketrening har vist seg å vera ein effektiv måte å auka proteinsyntesen akutt (Burd et al., 2009) og den forgrina aminosyra leucin ser ut til spela ei viktig rolle her. Ved styrketrening og proteininntak er det òg rapportert om auka aktivitet i dei anabole signalvegane intramuskulært, kor signalprotein som mTOR, p70S6k og 4E-BP1 auka fosforylering, medan fosforylering av eEF2 vert redusert (Dreyer et al., 2008).

### **2.1.1 Muskelproteinbalanse: eit reknestykke**

Skjelettmuskulatur er eit produkt av to prosessar: proteinesyntese (MPS) og proteinnedbryting (MPB). Dersom MPS er større enn MPB, vil nettobalanse vera positiv og over tid resultera i muskelvekst (hypertrofi). Dersom MPB er større enn MPS, vil nettobalanse vera negativ og dette vil resultera i muskelsvinn (atrofi). Muskelmassen kan òg halda seg stabil ved likevekt mellom syntese og nedbryting (Devries & Phillips, 2015).

Ved inntak av protein vert nettobalanse positiv av to grunnar: 1. proteinesyntesen vert stimulert av hyperaminoacidemia<sup>1</sup> (Devries & Phillips, 2015) og 2. proteinnedbrytinga vert inhibert av hyperaminoacidemia (Biolo et al., 1997; Devries & Phillips, 2015; Greenhaff et al., 2008) og hyperinsulinemia<sup>2</sup> (Borsheim et al., 2004; Devries & Phillips, 2015; Greenhaff et al., 2008).

Auka syntese og redusert nedbryting som eit resultat av næringsinntak og/eller trening, er forbigåande, og nettobalanse vil verte negativ. Ved inntak av eit nytt proteininhaldig måltid, vil syntesen få eit nytt stimuli og nedbrytinga inhiberast. Slik svingar proteinbalansen gjennom ein dag. Proteinesyntesen varierer 4-5 gongar meir enn nedbrytinga, og er meir sensitiv for ulike stimuli, som inntak av protein og styrketrening (Morton, McGlory, & Phillips, 2015). Det har blitt funne sterk korrelasjon mellom proteinesyntese og proteinnedbryting (Phillips, Tipton, Aarsland, Wolf, & Wolfe, 1997). Dette kan indikera at MPS og MPB er til dels avhengige av kvarandre til tross for mindre variasjon i MPB. Av den grunn vil det vera viktig å studera både MPS og MPB i samband med effekt av trening på muskulære adaptasjoner for å ei forståing av heile biletet.

### **2.1.2 Akutt effekt av styrketrening på muskelproteinbalansen**

Studiar har vist at både proteinesyntesen (målt som fractional synthetic rate - FSR) og - nedbrytinga (fractional breakdown rate - FBR) aukar i etterkant av ei styrketreningsøkt samanlikna med kvilestatus, i faste (Biolo, Maggi, Williams, Tipton, & Wolfe, 1995). Nettobalanse auka samanlikna med kviletilstand som fylgje av større relativ auke i MPS

---

<sup>1</sup> Hyperaminoacidemia er ein tilstand kor mengd aminosyrer i blod er over normalområdet.

<sup>2</sup> Hyperinsulinemia er ein tilstand kor mengd insulin i blod er over normalområdet

enn MPB og var ikkje signifikant forskjellig frå null tre timer etter treningsøkta (Biolo et al., 1995). Treningsindusert auke i MPS er meir langvarig hjå utrente samanlikna med trenar individ (Damas, Phillips, Vechin, & Ugrinowitsch, 2015).

## **2.2 Proteinets funksjonar i kroppen**

Skjelettmuskelvev er det største lageret av protein i kroppen (43%) og omsetnaden av protein i kroppen er på 1-2% kvar dag (Skålhegg, 2012). Protein består av lange kjeder med aminosyrer. Rekkefølja på aminosyrene, faldinga av proteinet og interaksjonen med andre protein avgjer proteinets funksjon i kroppen (Raastad, 2011; Skålhegg, 2012). Protein har mange forskjellige funksjonar og oppgåver, blant anna oppbygging og vedlikehald av muskulatur og skjelett, transport av oksygen og næringsstoff i blodet og signalering. Aminosyrene sirkulerer rundt i blodet og konsentrasjonen er styrt av opptak frå tarm og opptak til vev. Konsentrasjonen av aminosyrer intracellulært er høgare enn ekstracellulært (Skålhegg, 2012). Mengda intracellulære aminosyrer er eit resultat av næringsinntak, opptak i cella, aminosyre-resirkulering og forbruk i cella (Dodd & Tee, 2012). Totalt inngår 20 forskjellige aminosyrer i proteinsyntesen, åtte av dei er essensielle for vaksne (ti for barn). Essensielle aminosyrer (EAA) er aminosyrer kroppen ikkje kan produsera sjølv og dermed må få tilført gjennom kosten. Av desse essensielle aminosyrene, er tre av dei såkalla forgreina aminosyrer (BCAA/FAA): valin, leucin og isoleucin. Dei forgreina aminosyrene skil seg frå resterande aminosyrer ved at dei vert metabolisert i skjelettmuskulaturen og ikkje i levra. Dei forgreina aminosyrene utgjer ein stor del av aminosyrene som vert inkorporert i muskelcelleprotein (Raastad, 2011). Av dei forgreina aminosyrene har leucin fått mykje merksemd, hovudsakleg grunna effekten på proteinsyntesen.

### **2.2.1 Aminosyrer og essensielle aminosyrer**

Som nemnt tidlegare vil inntak av næring, primært protein, stimulera myofibrillær proteinsyntese. MPS aukar etter inntak av både blanda aminosyrer og essensielle aminosyrer (EAA) i fastande tilstand (Tipton, Ferrando, Phillips, Doyle, & Wolfe, 1999). Auken i proteinsyntesen og netto balanse var den same for både EAA-gruppa og gruppa som inntok både essensielle og ikkje-essensielle aminosyrer. Ut av dette forstår me at det truleg er dei essensielle aminosyrene som stimulerer MPS, samt at dei ikkje-essensielle aminosyrene ikkje vil gi ekstra stimuli til MPS (Tipton et al., 1999). Dette har blitt vist i studien til Smith et al. (1998) kor dei fann at dei essensielle aminosyrene

fenylalanin og threonin stimulerte proteinsyntesen i motsetnad til dei ikkje-essensielle aminosyrene arginin, gycin og serin (Smith, Reynolds, Downie, Patel, & Rennie, 1998). Det er gode bevis for at leucin i seg sjølv stimulerer proteinsyntesen via mTORC1 i cellekulturar, mens i humanstudiar er funna sprikande (Dodd & Tee, 2012).

### **2.2.2 ”Leucin-trigger”-hypotesen**

Leucin har fått spesielt mykje merksemd på grunn av si evne til å stimulera proteinsyntesen (Dodd & Tee, 2012) og inhibera proteolysen (Nakashima, Ishida, Yamazaki, & Abe, 2005). MPS auka mest etter inntak av myse samanlikna med soya og kasein etter treningsøkt (Tang, Moore, Kujbida, Tarnopolsky, & Phillips, 2009). Funna som indikera dette baserer seg på samanlikningar mellom myse, soya og kasein. Tang et al. (2009) viste at myse vert fordøya raskt og fører til ein hurtig auke i [leucin] i plasma, i motsetnad til kasein som vert fordøya langsamare. Vidare har det blitt vist at leucin, men ikkje isoleucin og valin, stimulera mTOR og signalprotein nedstrøms for mTOR, som p70S6K, 4E-BP1 og eIF hjå rotter (Anthony et al., 2000), som fører til initiering av translasjon og auka proteinsyntese. I tillegg er det blitt vist at leucin inhiberer proteinnedbrytinga hjå rotter (Nagasawa, Kido, Yoshizawa, Ito, & Nishizawa, 2002). Dosar på 2g leucin ser ut til å vera nok til å trigga MPS (Nongonierma & FitzGerald, 2015). Begrepet ”leucin-trigger” (Phillips, 2014) stammar opphavleg frå Burd og medarbeidarar sin review (Burd et al., 2009) kor det vart diskutert forskjellige faktorar som kan forklara kvifor myse visar seg å stimulera MPS i størst grad.

I 2014 vart det gjort ein stor studie på 40 menn, kor det vart eksperimentert med ulike dosar myse og innhald av leucin. Det vart nytta fem forskjellige proteinsupplement: 25g myse (3g leucin), 6,25g myse (0,75g leucin), 6,25g myse (3g leucin), 6,25g myse (5g leucin) og 6,25g myse (5g leucin, 1g isoleucin og 1g valin). I denne studien fann dei at inntak av 25g myse og 6,25g myse + 5g leucin førte til signifikant større auke i myofibrillær proteinsyntese 1,5 til 4,5 time etter ei unilateral styrketreningsøkt samanlikna med dei andre proteinsupplementa. Desse funna gjaldt både for beinet som trena og for beinet som ikkje trena. Det var heller ingen forskjellar mellom trena og ikkje-trena bein (Churchward-Venne et al., 2014). I ein studie av Tipton og medarbeidarar observerte dei ei auka stimulering av MPS etter inntak av protein og ekstra leucin – likevel var ikkje denne auken større samanlikna med den observert etter

inntak av 20g myseprotein i ein tidlegare studie av Tipton og medarbeidarar frå 2007 (Tipton, Elliott, Ferrando, Aarsland, & Wolfe, 2009).

Oppsummert ser det ut til at leucin kan spela ei viktig rolle i stimuleringa av myofibrillær proteinsyntese, ettersom ein suboptimal dose (6,25g myse) protein tilsett 5g fritt leucin kan stimulera MPS i same grad som 25g myse. Det ser òg ut til at dersom total proteinmengde utgjer i overkant av 20g (med ca. 10g EAA), vil ikkje ytterlegare mengder leucin (5g) auke proteinsyntesen vidare. Funn frå studiar utført på dyr og cellekulturar er ganske eintydige, medan funn frå humanstudiar er meir sprikande og det er ikkje konsensus at leucin per se triggar proteinsyntesen, sjå W. K. Mitchell et al. (2015b).

## **2.3 Proteininntak og styrketrening**

### **2.3.1 Akutte effektar av styrketrening og proteininntak**

Som nemnt tidlegare, er muskelproteinbalansen eit resultatet av muskelproteinsyntese (MPS) minus muskelproteinbryting (MPB). Etter éi styrketreningsøkt vert både proteinbrytinga og -syntesen stimulert. Nettobalanse vert ikkje positiv som fylgje av ei treningsøkt åleine, men den ligg rundt null med trend mot minussida i fastande tilstand (Biolo et al., 1995). Dersom protein vert inntekta etter styrketreningsøkt, vil MPS auka ytterlegare, MPB verte inhibitert og netto balanse verte positiv (Burd et al., 2009; Churchward-Venne, Burd, & Phillips, 2012a; Tipton et al., 2007) – dette delvis på grunn av auka transport av aminosyrer inn i muskel (Biolo et al., 1995).

Proteinsyntesen vil framleis vera forhøgja 48 timer etter treningsøkta hjå utrente (Phillips et al., 1997). Òg Damas og medarbeidarar konkluderer med at utrena har ein meir langvarig auke i proteinsyntesen samanlikna med trena individ. Det er truleg derfor utrente har større potensiale til å auka muskelmasse og -styrke (Damas et al., 2015).

Ved infusjon av aminosyrer (AA) etter trening, som fører til hyperaminoacidemia, auka proteinsyntesen signifikanlt meir enn ved infusjon av AA i kvile. I tillegg vart det ikkje observert noko endring i proteinbryting verken i kvile eller etter trening (Biolo et al., 1997). Dette kan tyda på at hyperaminoacidemia etter trening fører til reduksjon i proteinbryting, då trening aleine fører til auka proteinbryting (Phillips et al.,

1997). Styrketrening fører til at muskelens sensitivitet for aminosyrer (aminoacidemia) aukar. Denne sensitiviteten er auka til og med 24 timer etter ei styrketreningsøkt, som vist i studien til Burd et al. (2011), kor dei fann signifikant auka myofibrillær proteinsyntese 24-27 timer etter styrketrening. Dette kan støtta teorien om at så lenge dagleg inntak av protein er tilstrekkeleg, er det ikkje av like stor betydning for muskelvekst over tid om inntaket kjem direkte etter treningsøkt eller på eit seinare tidspunkt (Schoenfeld, Aragon, & Krieger, 2013).

Inntak av 25g myseprotein aukar myofibrillær proteinsyntese 3 timer etter inntak, og var framleis forhøgja 5 timer etter inntak samanlikna med fastande. Dersom myse-inntak vert kombinert med ei styrketreningsøkt, aukar den myofibrillære proteinsyntesen raskare (<1 time versus <3 timer) og held fram med å vera forhøgja til og med 5 timer etter trening og næringsinntak. I tillegg er responsen større ved same tidspunkt ved å kombinera trening og inntak av 25g myse samanlikna med proteininntak i seg sjølv (Moore, Tang, et al., 2009b). Det har ikkje blitt observert forskjellar mellom kvinner og menn i respons på MPS etter styrketrening og proteininntak, til tross for store forskjellar i sirkulerande testosteron (West et al., 2012).

### **2.3.2 Longitudinelle effektar av regelbunden proteininntak og styrketrening**

Dersom styrketrening og proteininntak vert kombinert over tid ( $\geq 6$  veker), vil det resultera i hypertrofi (Cermak, Res, de Groot, Saris, & van Loon, 2012). I meta-analysen til Cermak og medarbeidalar vart heile 22 randomiserte, kontrollerte studiar med yngre og eldre inkludert. Dei fann at proteinintak samanlikna med placebo, førte til signifikant auka feittfri masse utan forskjellar mellom yngre og eldre eller trenar og utrent. Supplementering med protein gav positiv effekt på éin repetisjon maksimum (1RM) i beinpress etter  $\geq 6$  veker med regelbunden styrketrening. Hjå yngre personar auka tverrsnittsarealet av type I- og type II-fiber som fylgje av styrketrening og proteinintak (Cermak et al., 2012). Det har blitt vist at hjå utrente kan 4 veker med styrketrening åleine vera nok til å auke tverrsnittsareal og tjukn av musklar i quadricepsgruppa. For utrente i denne fasen gav proteinintak derimot ikkje vidare auke (Boone, Stout, Beyer, Fukuda, & Hoffman, 2015).

Utrente personar som trenar styrketrening regelbunden 2 - 3 gonger per veke, i 12 veker og har tilstrekkeleg næringsinntak (protein), vil kunne forventa rundt 1% auke i 1RM per treningsøkt (Kraemer et al., 2002), dette tilsvara rundt 30 - 40% auke i 1RM etter dei første 12 vekene. Individuelle variasjonar må tas omsyn til. Dei 6 – 8 første vekene av eit styrketreningsopplegg vil resultera i relativt stor auke i 1RM (Kraemer et al., 2002), deretter vil responsen gradvis flata ut.

12 veker med styrketrening 2-3 gongar per veke og inntak av protein, karbohydrat eller ein blanding av begge direkte etter kvar treningsøkt, resulterte i signifikant auke i feittfri masse hjå forsøkspersonane i Hulmi og medarbeidarar si studie (2015). Ein signifikant nedgang feittmasse vart òg målt, men berre for dei som inntok protein (Hulmi et al., 2015). Òg etter 9 månadar med styrketrening og supplement, viste myseprotein å vera overlegen i utvikling av muskelmasse / auke i lean body mass (LBM) samanlikna med soya og karbohydrat til tross for ingen forskjell i styrke mellom gruppene (Volek et al., 2013). Farnfield og medarbeidarar fann ingen forskjell i styrke etter 12 vekers treningsintervensjon mellom personar som inntok myseprotein og personar som inntok placebo. Dette kan skuldast at basal proteininntak var adekvat i begge grupper og at meir protein ikkje gav større utteljing. Heller ikkje fosforylering av signalproteina Akt, mTOR, 4E-BP1, p70S6k, rpS6 eller eIF4G endra seg frå før til etter intervensionen verken for yngre som inntok myse eller placebo. Den einaste forskjellen mellom myse og placebo i signalering, var fosforylering av mTOR, som var signifikant større både før og etter treningsintervensjonen for gruppa som inntok myseprotein (Farnfield, Breen, Carey, Garnham, & Cameron-Smith, 2012). Hulmi og medarbeidarar (2009) gjorde ein intervensionsstudie som gjekk over 21 veker med tung styrketrening og supplementering med anten 15g myse før og etter trening eller placebo (0 kilokaloriar) (Hulmi, Kovanen, et al., 2009a; Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009b). Gruppa som inntok protein før og etter kvar treningsøkt auka tjukn i m. vastus lateralis signifikant både etter 10,5 og 21 veker ut i intervensionen, medan placebogruppa hadde signifikant auke etter 21 veker. Det same gjaldt for auken som vart målt i kropps masse (Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009b). Det var generelt større aktivitet i anabole signalvegar hjå proteingruppa før intervensionen, men dette endra seg etter 21 veker med styrketrening og det var i stor grad lågare respons bortsett frå fosforylert mTOR, 4E-BP1 og eEF2, som ikkje endra seg stort frå før til etter intervensionen. p70S6k var fosforylert i større grad enn placebo og kontroll 1 time etter første akuttøkt. Denne responsen var ikkje å finna igjen

etter 21 veker med trening. Òg mTOR viste signifikant auka fosforylering frå basal til 1 og 48 timer etter treningsøkt, og etter intervensionen, men ingen forskjell mellom gruppene (Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009b). Biopsiane som var tekne etter intervensionen vart tekne i kvile og personane var fastande.

Treningsstatus kan vera ein bestemmande faktor for proteinsyntesen sin respons på styrketrening akutt. Dette vart demonstrert i ein akuttstudie kor trena bein visar ein signifikant høgare topp i FSR samanlikna med utrent bein (etter 8 vekers treningsintervasjon). Samtidig vart det observert ein meir langvarig auke i FSR i utrent bein inntil 28 timer etter treningsøkt, medan FSR i trena bein då hadde returnert til basalverdi (Tang, Perco, Moore, Wilkinson, & Phillips, 2008). Dette tyder på at treningsstatus vil påverka proteinsyntesen og at trena potensielt har eitt mindre ”anabolsk vindauge” på å innta protein etter treningsøkt. På den andre sida har studiar funne at timing på proteininntak ikkje spelar noko rolle på utvikling av hypertrofi som fylgje av ein lengre treningsperiode så lenge dagleg energi- og proteinbehov er dekka (Atherton & Smith, 2012; Schoenfeld et al., 2013).

### **2.3.3 Distribusjon av proteininntak**

Inntak av ein bolus med protein (som fører til aminoacidemia) etter trening auka MPS i større grad enn proteininntak i mindre dosar (West et al., 2011). Derfor vil protein som vert fordøya og absorbert raskt (som myoseprotein) gi ein høgare maksimal verdi (topp) i plasmakonsentrasjon enn protein som vert fordøya treigare (som kasein), likevel kan AUC (areal under kurven) vera likt. Påstanden om at aminoacidemia fører til auka MPS er likevel litt omdiskutert, og resultat frå ulike studiar er sprikande. Mitchell og medarbeidrarar fant ingen forskjell i FSR i kvile mellom éin bolus (á 15g EAA) og fire mindre dosar (á 3,75g EAA) protein (W. K. Mitchell et al., 2015b). Derimot fant Areta og medarbeidrarar at 4 dosar á 20g stimulerte MPS meir enn 8 dosar á 10g, 2 dosar á 40g og 1 dose á 80g i etterkant av ei treningsøkt (Areta et al., 2013).

### **2.3.4 Proteininntak: Mengde**

Kor mykje protein er nok og kor mykje protein er for masse? Witard og medarbeidrarar (2014) gjorde ein studie der 0g-, 10g-, 20g- og 40g-dosar myseisolat vart samanlikna. Dei fann at 20g var optimal dose for å maksimalt stimulera myofibrillær MPS, i tillegg viste det seg at ein dose á 40g ført til oksidasjon av aminosyrer og auka urea-

produksjon (Witard et al., 2014). Moore og medarbeidarar (2009) undersøkte effekten av proteininntak frå egg mellom 0 – 40g på MPS i etterkant av ei styrketreningsøkt. Resultata viste at det var dose-respons for proteinmengder opptil 20g, kor 40g ikkje førte til ytterlegare auka i FSR (Moore, Robinson, et al., 2009a). Det same gjaldt for albumin protein syntese (APS). Auka albumin protein syntese kan vera ein indikasjon på for høgt inntak av protein, og i staden for at kroppen oksidera aminosyrene, vert overflodige aminosyrer inkorporert i nydanning av albumin (De Feo, Horber, & Haymond, 1992). I studien til Moore og medarbeidarar, auka ikkje APS meir frå 20g til 40g, som kan føra til konklusjonen om at APS har nådd maks kapasitet og at proteininntak over 20g vil føra til oksidasjon av aminosyrer. I ein artikkel, kor 6 ulike studiar var analysert, vart det konkludert med at proteininntak på 0,24g/kg kroppsvekt eller 0,25g/kg feittfri masse er nok til å maksimalt stimulera proteinsyntesen hjå unge, friske menn (Moore et al., 2015).

Inntak av 20g essensielle aminosyrer (EAA) i kvile viste ingen vidare auke i FSR samanlikna med 10g EAA (Cuthbertson et al., 2005). Dette fenomenet vert kalla ”muscle full” (Dideriksen, Reitelseder, & Holm, 2013) og går ut på at til tross for tiljengelege aminosyrer, sirkulerande i blod, aukar ikkje MPS ytterlegare, men når ein topp rundt 1,5 time, for å dernest returnera til utgangsverdi (Atherton et al., 2010a). ”Muscle full” vert støtta av fleire studiar, deriblant ei studie av Atherton et al (2010) kor unge, friske menn inntok 48g myseprotein (i kvile). Resultata viste at sjølv om [EAA] i plasma var forhøgja 180 min etter inntak, returnerte MPS til basalsnivå etter 90 min (Atherton et al., 2010a). Studien til Mitchell et al (2015) viste at den anabole responsen ikkje er avhengig av om kroppen får ein bolus med protein – altså eit kraftig stimuli, eller fleire mindre dosar spreidd over eit lengre tidsrom, då begge doseringsregimene resulterte i tilnærma lik MPS-respons til tross for signifikant forskjellig konsentrasjon av EAA og leucin i plasma. Kombinasjonen av styrketrening og proteininntak har vist seg å forskyva grensa for ”muscle full” oppover samanlikna med berre proteininntak, dette kan igjen resultera i ei større auke i proteinsyntese (Moore, Tang, et al., 2009b).

Oppsummert ser det derfor ut til at 15g EAA er meir enn nok til å maksimalt stimulera MPS (som nytta i studien til Mitchell og medarbeidarar frå 2015), og fleire studiar har vist at omlag 20g protein (8,5 – 10 g EAA) må til for å maksimalt stimulera MPS hjå friske, unge menneske (Areta et al., 2013; Dideriksen et al., 2013; Moore, Robinson, et

al., 2009a; Witard et al., 2014). Eit inntak over 20g protein (10g EAA) vil truleg føra til oksidasjon av overflødige AA, men styrketrening kan forskyva denne grensa ved at muskulaturen kan utnytta større mengder protein grunna auka proteinsyntesen.

### **2.3.5 Proteinkjelder**

Kva type protein som vert inntekne avgjer kor stor auke i MPS ein kan forventa (Churchward-Venne, Burd, & Phillips, 2012a). Fleire studiar har blitt gjort der ein har samanlikna respons i MPS etter inntak av ulike proteinkjelder, blant anna myse, soya og kasein. Hastigkeit på fordøyning vert trekt fram som ein viktig faktor som påverkar proteinsyntesen. Protein som vert fordøya raskt (myse og soya) gir ein rask auke av [aminosyrer] i plasma og dernest ein stor auke i MPS. Protein som vert fordøydd treigare (kasein) gir ein lågare topp-plasmakonsentrasijsn, men som varer over lengre tid og som hovudsakeleg inhiberer proteinnedbrytinga (Burd et al., 2009). Studien av Tang og medarbeidarar (2009) viste at myse stimulerer MPS i større grad enn kasein 3 timer etter styrketreningsøkt, til tross for same innhald av EAA (Tang et al., 2009). Det var små forskjellar i innhald av leucin: myse – 2,3g, soya – 1,8g, kasein – 1,8g. Leucinmengd kan ha vore delvis utslagsgivande for forskjellar i MPS-auken, i tillegg til at fordøyninga av kasein går treigare. Dermed får ein ikkje den store auken i plasmakonsentrasijsn – aminoacidemia, som kan påverka MPS. I en studie av Reitelseder et al. (2011) kor myse og kasein vart samanlikna, fann dei derimot ingen forskjell i MPS, målt 6 timer etter ei styrketreningsøkt til tross for litt ulike mønster i stimulering av MPS i den første (1 – 3,5 time) og den andre (3,5 – 6 timer) fasen av restitusjonen. Dette byggjer opp under teorien om at myse gir eit kraftig, men relativt kortvarig stimuli til proteinsyntesen, medan kasein gir mindre stimuli, men som varar over lengre tid. På bakgrunn av desse funna, ville det vore interessant å studera forskjellar mellom myse og mjølk for å sjå om mjølk, som består av 20% myse og 80% kasein, totalt sett gir eit betre og meir langvarig stimuli til MPS enn myse åleine. Dette har Mitchell og medarbeidarar (2015) undersøkt. Dei fann auka FSR 0 – 90 minutt etter inntak av 20g myseprotein eller inntak av mjølkeprotein, men ingen forskjell mellom gruppene. Etter 90 – 210 minutt var FSR tilbake til utgangsverdi (fastande) for begge gruppene (C. J. Mitchell et al., 2015a).

Heller ikkje godt trenar ser ut å til å få betre effekt av å innta myse i 8 veker kombinert med styrke- og hurtigheitstrening samanlikna med inntak av kasein. Dette fann Wilborn

et al. (2013) i sin studie gjennomført med kvinnelege, trena basketballspelarar. Til tross for at alle basketballspelarane auka styrke, agility og lean mass, var det ingen forskjell mellom supplementgruppene (Wilborn et al., 2013).

I studien til Hartman og medarbeidarar (2007) vart myse, soya og karbohydrat (kontrollgruppa) gitt til unge styrkeløftarar i samband med styrketrenin over 12 veker. Alle auka 1RM i styrkeøvingane, men det var ingen forskjell mellom supplementa, likevel viste mjølkegruppa signifikant større endring i feitt- og beinfri masse enn både soya og kontroll (Hartman et al., 2007). Det vart òg observert ein auke i areal i type II-fiber for alle gruppene, men mjølkegruppa hadde signifikant større auke enn soya og kontroll (Hartman et al., 2007).

Tilsynelatande kan det virke som noko av auken i MPS skuldast plasmakonsentrasjonen av EAA/leucin. I ein studie gjort på rotter viste det seg at leucin stimulerte MPS i større grad enn dei andre forgreina aminosyrene isoleucin og valin. I tillegg auka fosforylering av fleire viktige protein i signaleringskaskadar, som 4E-BP1, p70S6K og eIF som følgje av leucininntak. Det vart ut ifrå funna konkludert med at stimuleringa av MPS skjer gjennom mTOR-signalvegen hos rotter (Anthony et al., 2000). Dette understrekar at myse er overlegen kasein og soya i stimulering av MPS i den tidlege fasen etter styrketrenin og/eller inntak.

Ein større intervensionsstudie som føregjekk over 9 månadar, kor myse vart samanlikna med soya og karbohydrat, viste dataa ein signifikant større auke i muskelmasse (målt i lean body mass - LBM) ved myse-supplementering i forhold til karbohydrat- og soya-supplementering. Dette til tross for at myse- og soya-gruppene hadde same daglege inntak av protein (1,4g / kg kroppsvekt) (Volek et al., 2013). Studiar har funne at inntak av leucin fører til rask auke i [leucin] i blod og leucininnhald intramuskulært (D. J. Wilkinson et al., 2013). Volek et al. (2013) fann at fastande [leucin] i plasma auka signifikant frå før til etter intervension i mysegruppa i motsetnad til soya- og karbohydratgruppene. Effekten av myse observert i studien til (Volek et al., 2013) kan moglegvis tilskrivast innhaldet av leucin i myseprotein.

Ut i frå studiane referert til ovanfor, ser det ut til at myseprotein både stimulerer MPS i større grad enn kasein 3 timer etter ei styrketreningsøkt (på grunn av hastigheten på

fordøyning og leucininnhald), og fører til større auke i muskelmasse samanlikna med soya. Dersom MPS vert målt over 6 timer, finn ein derimot ingen forskjell mellom myse og kasein, truleg fordi kasein vert fordøydd treigare, men opprettheld MPS over lengre tid.

### **2.3.6 Behandling av mjølkeproteinfraksjonar**

Mjølkeprotein består av myseprotein og kaseinar. Det er ulike måtar å framstilla mjølkeprotein på som styrer tilgjengelegheten av aminosyrer og måten proteina vert fordøya. Ettersom det er myseprotein som er nyttå i denne studien, er dette av størst interesse i denne oppgåva. Det vert skilt mellom mikropartikulær myse (MM), hydrolysert myse (HM), nativ myse (NM) og mysekonsentrat (MK). MM, HM og MK vert utsett for varme og enzym, medan NM vert behandla på lågare temperatur og vert filtrert. Laahne (2013) fann at inntak av nativ myse resulterte i større [leucin], [FAA] og [EAA] i blod samanlikna med inntak av MM, HM, MK og lettmjølk.

### **2.3.7 Oppsummering**

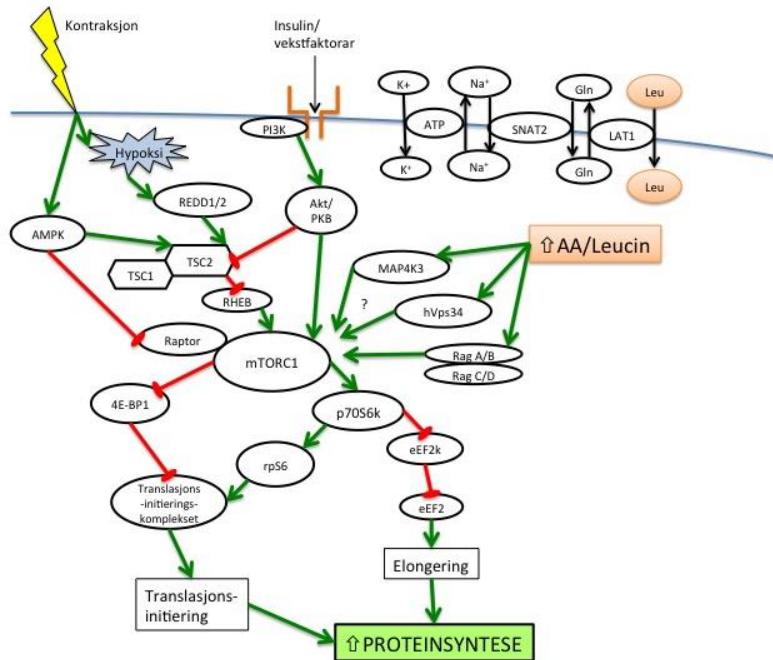
Styrketrening og proteininntak i kombinasjon fører til positiv netto proteinbalanse og kombinasjonen gjentekne gonger over tid, vil resultera i hypertrofi. Utrente har naturlegvis større potensiale for hypertrofi, men protein i kombinasjon med styrketrening vil også kunne gi eit sterkt stimuli til personar som i utgangspunktet er trenar. For optimal anabol respons, ser det ut til at protein bør konsumerast direkte etter ei styrketreningsøkt, men grad av hypertrofi ser ikkje ut til å verte påverka tidspunkt for proteininntak så framt dagleg inntak er adekvat. 20g protein av høg kvalitet (10g EAA) ser ut til å gi maksimal effekt på MPS, men med styrketrening kan kroppen potensielt utnytta større mengder. Mjølk vert trekt fram som ei særskilt kjelde til protein, og spesielt myseprotein grunna fordøyingshastigkeit og innhald av EAA.

## **2.4 Intracellulær signalering**

Proteinsyntese i skelettmuskulatur er eit resultat av to prosessar: transkripsjon og translasjon. Desse prosessane vert påverka av forskjellige stimuli, som mekanisk drag, vekstfaktorar og hormon (insulin, testosteron, IGF-1) og ernæringsstatus (for eksempel tilgjengelege aminosyrer) (Raastad & Paulsen, 2010).

Insulin og aminosyrer stimulerer viktige signalvegar for auka initiering av translasjon og proteinsyntese gjennom forskjellige, men òg nokre av dei same mediatorane i signaleringskaskadane (Burd et al., 2009; Dodd & Tee, 2012). Når insulin vert bunde til sin reseptør på muskelcella, vert PI3-kinase aktivert, som fører til initiering av ein signaleringskaskade kor Akt (PKB) fosforylera og aktivera mTOR, som deretter aktivera p70S6K og 4E-BP1, som til slutt fører til initiering av translasjon og auka proteinsyntese (Burd et al., 2009).

Aminosyrene aktiverer mTORC1, som insulin, men truleg ikkje gjennom akkurat dei same mediatorane. Det er framleis noko usikkert gjennom kva for signalprotein mTOR vert aktivert av aminosyrer, men sannsynligvis er hVps34 (Byfield, Murray, & Backer, 2005), MAP4K3 og Rag GTPasar involvert (Dodd & Tee, 2012). Aktive Rag-kompleks kan verte bunde til mTORC1 og translokera mTORC1 til lysosommembranoverflata kor Rheb er lokalisert. I reguleringa av mTORC1, ser det ut til at lokaliseringa av mTORC1 til lysosom-membranens overflate er det mest kritiske punktet. Gjennom kva for mekanismar hVps34 aktiverer mTORC1 og om hVps34 sansar aminosyrer er omdiskutert og litteraturen viser til sprikande funn. MAP4K3 er tilsynelatande ikkje nødvendig for aktivering av mTORC1, men aktiveringa via MAP4K3 ser ut til å betra vidareføringa av signal frå mTORC1 (Dodd & Tee, 2012).



Figur 1: forenkla oversikt over intracellulær signalering basert på følgjande studiar: Aas, 2014; Apró, 2014; Dodd & Tee, 2012; Drummond, Dreyer, Fry, Glynn, & Rasmussen, 2009; Hornberger, 2011; Kumar, Atherton, Smith, & Rennie, 2009a; Philp, Hamilton, & Baar, 2011; Sandri, 2008. NB! Auka fosforylering av p70S6k fører til inhibering av eEF2k (som gjer at eEF2k ikke kan inhibera eEF2), som igjen fører til aktivering og redusert fosforylering av eEF2.

#### 2.4.1 mTOR

Mammalian/Mechanistic Target of Rapamycin (*mTOR*) består av to proteinkompleks: mTOR Complex 1 (mTORC1) og mTOR Complex 2 (mTORC2) (Adams & Bamman, 2012). mTORC1 er truleg en viktig regulator av hypertrofi i skjelettmuskulatur (Philp et al., 2011), derfor vil oppgåva vidare omhandle mTORC1, og vil verte referert til som mTOR.

Hastigheita på proteinsyntesen auka ved at mTOR vert aktivert, som regulerer initiering og elongering av translasjonen. Proteinsyntesen er ein kostbar prosess energimessig, og cellene vil derfor ”skru av” prosessen dersom det er lite energi tilgjengeleg (Dodd & Tee, 2012). Energistatus vil derfor vera av stor betyding for cellas proteinsyntese, og

dermed vil òg positiv energibalanse vera en føresetnad for hypertrofi. Ved lite tilgjengeleg energi i cella, i form av ATP, vert AMPK aktivert. AMPK vil deretter aktivera ULK1, som fører til autofagi. Motset vil aktivert mTOR føra til fosforylering av ULK1 (på eit anna bindingssete enn AMPK) og inhibera autofagi. I tillegg tyder det på at mTORS aktivering av ULK1, òg fører til inhibering av AMPK sin interaksjon med ULK1 og dermed hindrar autofagi (Egan, Kim, Shaw, & Guan, 2011).

mTOR vert aktivert ved fosforylering som er eit resultat av styrketrening, men òg av ernæringsstatus, og er sensitiv for aminosyrer (Adams & Bamman, 2012). I ein studie av Dreyer og medarbeidarar (2008) fann dei blant anna at auka fosforylering av mTOR etter styrketrening auka i enda større grad ved inntak av essensielle aminosyrer og karbohydrat (Dreyer et al., 2008). Inntak av essensielle aminosyrer (med ekstra leucin) og karbohydrat 1 time etter styrketreningsøkt førte til ein større auke i MPS samanlikna med treningsøkt utan protein-og karbohydratinntak (Dreyer et al., 2008). I tillegg fant Dreyer og medarbeidarar auka fosforylering av p70S6k1 og 4E-BP1. Desse funna kan tyda på at aktivering/fosforylering av mTOR-signalvegen delvis kan forklara auken i MPS. Denne studien har målt FSR i tillegg til signalering, som er viktig for å kunne avdekka samanhengar mellom signalering og MPS. Ein skal likevel vera forsiktig med å fastslå at det føreligg kausalitet då éin signalvei sannsynlegvis berre er ein brøkdel av heile bildet.

#### **2.4.2 p70S6k**

mTOR er en viktig regulator av muskelmasse og hypertrofi, truleg gjennom fosforylering av 70 kDa S6 protein kinase (p70S6k) og 4E-BP1, som igjen fører til økt initiiering av translasjon (Adams & Bamman, 2012; Churchward-Venne, Burd, & Phillips, 2012a). Forskjellar i hypertrofi har blitt assosiert med blant anna aktivering av p70S6k-signalering (Adams & Bamman, 2012). p70S6k ligg nedstraums for mTOR og er ein seronin/threonin kinase. For aktivering av p70S6k er det kritisk at dei to bindingsseta Thr229 og Thr389 vert fosforylert (Pullen & Thomas, 1997). Fosforylering av Thr389 skjer innan 1-2 timer etter styrketreningsøkt (Dreyer et al., 2006) med påfølgjande proteininntak (Camera et al., 2015; D'Souza et al., 2014).

Aktivert p70S6k kan blant anna fosforylera ribosomalt S6 protein (rpS6), sjølv om dette truleg ikkje er den viktigaste funksjonen til p70S6k (Adams & Bamman, 2012). p70S6k

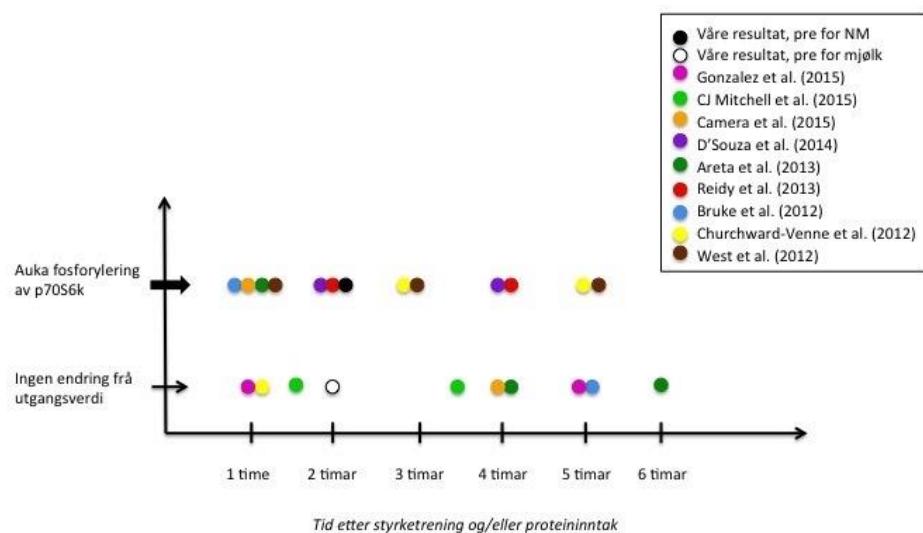
deltar i reguleringa av translasjonsinitieringa gjennom fosforylering av initieringsfaktorar som eIF4B, som dannar initieringskomplekset (Adams & Bamman, 2012; Dodd & Tee, 2012). I tillegg regulerer p70S6k fleire elongeringsfaktorar (Dodd & Tee, 2012). I studiar gjort på rotter har det blant anna blitt vist at leucin er unik blant dei forgreina aminosyrene i stimulering av MPS gjennom mTOR-p70S6k-signalvegen (Anthony et al., 2000). I tillegg er det vist at fosforylering av p70S6k aukar med aukande dosar leucin. Til tross for aukande grad av p-p70S6k, var MPS tilnærma maksimalt stimulert ved mindre grad av fosforylert p70S6k (Crozier, Kimball, Emmert, Anthony, & Jefferson, 2005). Det har blitt observert ein sterk korrelasjon mellom fosforylering av p70S6k 6 timer etter trening og prosent endring i muskelmasse etter ein 6-vekers treningsintervensjon gjort på rotter (Baar & Esser, 1999). Dette fører oss til å tru at fosforylert p70S6k kan vera ein god markør for longitudinelle endringar i muskelmasse som fylgje av styrketrening.

Som inaktiv, er p70S6k bunde til eIF3 (ein del av pre-initieringskomplekset – PIC). Når mTORC1 vert aktivert, vert komplekset bunde til eIF3-p70S6k og p70S6k vert aktivert. Aktivert p70S6k dissosierer frå eIF3 og p70S6k kan dermed aktivera målprotein nedstrøms for seg sjølv som rpS6 og eIF4B (Goodman, Mayhew, & Hornberger, 2011).

Inntak av 25g myseprotein samanlikna med placebo (smakstilsett vatn) etter styrketrening og 30 minutt uthaldsarbeid resulterte i signifikant større fosforylering av mTOR (1 time etter) og p70S6k (1 og 4 timer etter) i favør myse. Fosforylering av eEF2 (p-eEF2) minka signifikant 1 time etter trening og inntak, men ingen forskjell vart målt mellom gruppene (Camera et al., 2015). Det er derimot ikkje vist nokon forskjell i fosforylering av mTOR og p70S6k etter eksentrisk styrketreningsøkt og inntak av anten myse hydrolysat + karbohydrat eller isokalorisk karbohydrat til tross for at både p-mTOR og p-p70S6k auka i trena bein 3 timer etter økt (Rahbek, Farup, de Paoli, & Vissing, 2015). Rahbek og medarbeidarar (2014) gjorde òg ein treningsintervensjon over 12 veker kor inntak av myse + karbohydrat vart samanlikna med isokalorisk karbohydrat. Resultata viste ingen endring i mengde av blant anna mTOR og p70S6k, men total mengde 4E-BP1 minka signifikant etter konsentrisk trening samanlikna med eksentrisk trening (Rahbek et al., 2014).

I ein studie av Mitchell og medarbeidarar (2015) studerte dei forskjellar i blant anna anabol signalering og proteinsyntese etter inntak av 15g EAA i éin dose versus i fire mindre dosar á 3,75g. Det viste seg at fosforylert 4E-BP1 (p-4E-BP1) var signifikant auka frå fastande til 90 min etter inntak, det same gjaldt fosforylert p70S6k (p-p70S6k) i bolus-gruppa, medan ingen endring vart observert for p-eEF2 for nokon av tidspunkta (W. K. Mitchell et al., 2015b). Likevel vart det ikkje målt forskjell i FSR mellom doseringsregimene. (W. K. Mitchell et al., 2015b). Dette tyder på at p70S6k kan vera avhengig av eit kraftig stimuli, som ein bolus med protein, for å verte aktivert.

Det har blitt funne signifikant korrelasjon mellom fosforylert p70S6k 30 minutt etter ei styrketreningsøkt og endring i 1RM i knebøy, feittfrimasse, feittfrimasse i bein og tverrsnitt av type-IIa fiber etter 14 veker med regelbunden styrketrening (Terzis et al., 2008). Dette kan indikera at p-p70S6k kan vera ein prediktor for muskulære adaptasjonar til styrketrening.



Figur 2: oversikt over forskjellige studiar som har målt fosforylering av p70S6k i tida etter éi styrketreningsøkt og/eller proteininntak.

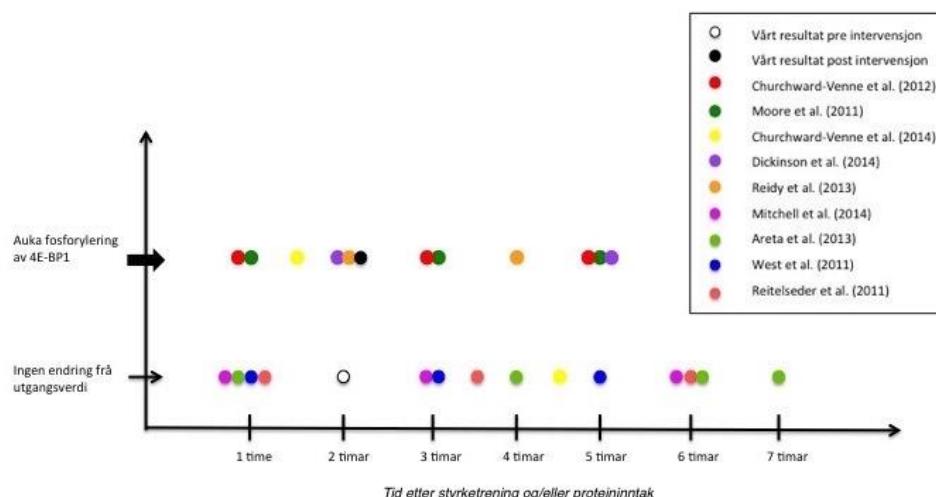
### **2.4.3 4E-BP1**

*eukaryot initieringsfaktor 4E-bindande protein 1 (4E-BP1)* vert inaktivert via fosforylering av mTORC1. Når 4E-BP1 ikkje er fosforylert, vert translasjonsinitieringa inhibert ved at 4E-BP1 er bunde til eIF4E, som er essensiell for at initieringskomplekset skal kunne binda seg til mRNA og starta cap-avhengig translasjon. Ved tilstrekkeleg fosforylering dissosierer 4E-BP1 frå eIF4E og initieringskomplekset kan verte fullstendig (Adams & Bamman, 2012; Dodd & Tee, 2012). Det er rapportert om sju bindingssester på 4E-BP1 (Hay & Sonenberg, 2004), der fullstendig aktivering av 4E-BP1 skjer i to steg (Gingras et al., 1999). mTOR fosforylera Thr37 og Thr46, dette fører likevel ikkje til dissosiasjon (Gingras et al., 1999). Fosforylering av Thr70 og deretter Ser65 fører til slutt til dissosiasjon frå eIF4E (Hay & Sonenberg, 2004).

I studiar kor samanheng mellom anabol signalering og proteinsyntese har blitt studert, har ein sett at auka fosforylering av 4E-BP1 opptrer i samband med auka proteinsyntese etter inntak av protein og at styrketrening vil forsterka denne auken ytterlegare (Churchward-Venne, Burd, Mitchell, West, et al., 2012b). Ved å gi eit treningsstimuli har det blitt funne minka fosforylering av 4E-BP1 direkte etter trening, men som har vore tilbake til utgangspunkt berre 1 time etter trening (Dreyer et al., 2006). Ved inntak av myseprotein (48g) åleine, utan treningsstimuli, har det blitt vist signifikant auke i fosforylering av 4E-BP1 100 minutt etter inntak (Atherton et al., 2010a).

Ved inntak av myseprotein i forbindelse med ei styrketreningsøkt var det ingen signifikant forskjell i fosforylering av 4E-BP1 Thr37/46 to timer etter økt samanlikna med placebo hjå yngre, sjølv om det var nesten 100% større inaktivering i myse-gruppa (Farnfield et al., 2012). Etter 12 veker med trening, var det ingen forskjellar i fosforylering av 4E-BP1 mellom myse- og placebogruppa (Farnfield et al., 2012). Forskjellige studiar visar til forskjellige resultat: 25g – 80g myse anten i éin dose eller fleire små har ikkje vist nokon effekt på fosforylering av 4E-BP1 (Areta et al., 2013; West et al., 2011), medan Mitchell og medarbeidarar fann auka fosforylering av 4E-BP1 etter 15g essensielle aminosyrer inntatt både i éin dose og fleire små (W. K. Mitchell et al., 2015b).

C2C12-myotubar inkubert med essensielle aminosyrer, avslørte at berre leucin stimulerte til fosforylering av mTOR og 4E-BP1 (Atherton, Smith, Etheridge, Rankin, & Rennie, 2010b). Dette har blitt bekrefta av in vivo-studiа kor det vart observert signifikant auke i fosforylering av 4E-BP1, så vel som mTOR og p70S6k. I tillegg fann dei signifikant nedgang i fosforylering av eEF2 etter inntak av essensielle aminosyrer med ekstra leucin og karbohydrat (Dreyer et al., 2008; Fujita et al., 2007).



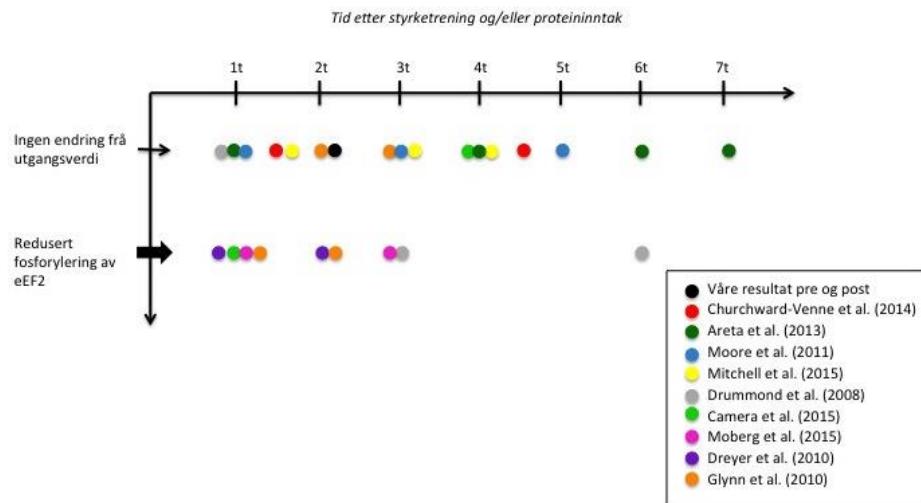
Figur 3: oversikt over forskjellige studiar som har målt fosforylering av 4E-BP1 i tida etter éi styrketreningsøkt og/eller proteininntak.

#### 2.4.4 eEF2

Når eukaryot elongeringsfaktor 2 (eEF2) vert hyperfosforylert vert den inaktiv og translasjonen vert redusert. Det er ein respons på høgt energiforbruk og AMPK vil kunne fosforylera eEF2k som eitt ledd i translasjonskontrollen (Adams & Bamman, 2012). Inaktivering av eEF2 er midlertidig og polysom-mRNA-komplekset held fram med å vera intakt. Dette fører til at så fort eEF2 vert aktivert igjen, held translasjonsprosessen fram (Adams & Bamman, 2012). eEF2 vert fosforylert av eEF2-

kinase, som igjen kan verte fosforylert og aktivert av AMPK (Goodman et al., 2011) eller defosforylert og inhibert av p70S6k (Drummond et al., 2009). I aktivert tilstand, vil eEF2k fosforylera og dermed inhibera eEF2, som fører til inhibering av elongeringsprosessen (Goodman et al., 2011).

Studiar som har sett på fosforylering av eEF2, rapporterer om sprikande funn. Inntak av leucin utan treningsstimuli ser ikkje ut til å ha nokon effekt på fosforyleringsstatus av eEF2 til tross for at p-p70S6k auka (D. J. Wilkinson et al., 2013). I studien til Mitchell og medarbeidrarar (2015) kor essensielle aminosyrer vart gitt med forskjellig doseringsmønster, fann dei ingen endring i fosforylering av eEF2 (W. K. Mitchell et al., 2015b). Areta og medarbeidrarar rapporterte om liknande funn etter tilsvarende studie, men med myseprotein (Areta et al., 2013). Heller ikkje ulike mengder av leucin ser ut til å ha effekt på p-eEF2 etter trening in vivo (Churchward-Venne et al., 2014). På den andre sida fann Camera og medarbeidrarar ein signifikant nedgang i fosforylering av eEF2 éin time etter trening og inntak av 25g myse så vel som placebo (Camera et al., 2015). Det same vart observert i studien til West og medarbeidrarar når myseprotein vart inntekta i fleire mindre dosar (West et al., 2011). Hjå styrketrente menn vart det observert ein signifikant auke i fosforylert eEF2-kinase både éin og fem timer etter trening uavhengig av proteininntak (bolus vs. fleire mindre dosar vs. placebo) (Burke et al., 2012), som igjen kan indikera auka fosforylering av eEF2 og dermed inhibering av elongeringa i translasjonen.



*Figur 4: oversikt over forskjellige studiar som har målt fosforylering av eEF2 i tida etter éi styrketreningsøkt og/eller proteininntak. Redusert fosforylering av eEF2 er ein indikasjon på auka aktivitet i anabole signalvegar.*

## 2.4.5 Oversiktstabell

Tabell 1: oversikt over utvalde akuttstudiar med styrketrening og påfølgjande proteininntak frå 2008 til 2015. Forklaringar: +: signifikant auke frå basal. -: signifikant nedgong frå basal. =: ingen endring frå basal. \*: forskjell mellom grupper. +/- (e): endring utelukkande hjå dei eldre. +/- (y): endring utelukkande hjå dei yngre. (S): supplement-gruppe, (K): kontroll-gruppe og (P): placebo-gruppe. KE: kneeekstensjon, TR: trening og KH: karbohydrat.

Forfattar	Design	FP	Protokoll	Signal protein	Effekt		
(Camera et al., 2015)	RCT/kryss-over	8 menn	8 x 5 reps, 80% av 1RM + 30 min sykkel på 70% av VO <sub>2peak</sub> . 25g myse eller placebo. 10t faste.	p70S6k eEF2	1t +* - =	4t - =	
(W. K. Mitchell et al., 2015b)	RCT	16 menn, unge	15g EAA: ein dose á 15g eller 4 dosar á 3,75g. Faste over natt.	p70S6k 4E-BP1 eEF2	1,5t +* +* =	3t = *+ =	4t =
(Reidy et al., 2013)	Dobbel blind RCT	17 menn, 2 kvinner	KE: 8 x 10 reps, 60% av 1RM. Proteinblanding eller myseprotein, 20g og 1,8g leucin i begge. 10t faste.	p70S6k 4E-BP1	2t + +	4t PB+ +	
(Moore, Atherton, Rennie, Tarnopolsky, & Phillips, 2011)	CT	7 menn	Unilateral styrketrening. 25g myseprotein. Faste over natt.	p70S6k 4E-BP1 eEF2	1t + + =	3t + + =	5t + + =
(Dreyer et al., 2010)	CT	9 menn, 8 kvinner	Unilateral KE: 10 x 10 reps, ca. 70% av 1RM. Faste over natt.	p70S6k 4E-BP1 eEF2	1t + =	2t + =	
(Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009b)		29 menn, utrente	Beinpress: 5 x 10 reps. 3 grupper: 15g myseprotein, placebo (0 kcal), kontroll. Inntak både før og etter treningsøkt.	p70S6k 4E-BP1 eEF2	1t +* =	48t =	=
(Drummond et al., 2008)		7 unge og 6 eldre menn	KE: 8 x 10 reps, 70% av 1RM. 20g EAA (35% leucin) inntatt 1t etter trening. Faste over natt.	p70S6k 4E-BP1 eEF2	1t + =	3t + + -	6t +(e) +(y) -
(Dreyer et al., 2008)	RCT	16 menn	KE: 10 x 10 reps, 70% av 1RM. 1t post TR: leucin-EAA + KH eller kontroll. Faste over natt.	p70S6k 4E-BP1 eEF2	1t + -	2t +* -	

## **2.5 Oppsummering**

Bygging av muskelmasse er komplekst: mange faktorar påverkar ei lang rekke prosessar som resulterer i adaptasjonar. Muskelmassen vil verte modulert ved trening og næringsinntak. Proteinsyntese og –nedbryting svingar alt etter kva stimuli som vert gitt. Hensiktsmessig styrketrening vil resultera i hypertrofi ved adekvat næringsinntak og dersom protein vert lagt inn i reknestykke, kan ein potensielt få større utbytte. Protein generelt, og myse spesielt, har vist seg å vera eit potent stimuli for proteinsyntesen. Fordøyingshastighet og leucininnhald vert trekt fram som viktige enkeltfaktorar. Intracellulært vert fleire anabole signalvegar aktivert som fylgje av mekanisk drag og proteininntak. Sjølv om proteinsyntesen aukar etter styrketrening og proteininntak, er det ikkje konsensus rundt kva som skjer i signalvegane. Nokre studiar finn ingen endring, medan andre finn signifikant nedgang i for eksempel eEF2 (figur 4). Det er eit stort og komplekst biletet med mange protein involvert i signaleringskaskadane.

### **3. Metode**

Masteroppgåva inngår som ein del av eit større doktorgradsprosjekt ved Norges Idrettshøgskole: Amarone-prosjektet. I Amarone-prosjektet er det blitt gjennomført fleire studiar der hensikta har vore å studera effekt av forskjellige proteintilskot og vanleg lettmjølk på styrketrening. Denne masteroppgåva er basert på éin av desse studiane: ein 12-vekers trenings- og suppleringsintervensjon med yngre forsøkspersonar (18 – 45 år). Det har blitt gjort mange målingar, men denne metodedelen vil i hovudsak berre innhalda informasjon som er relevant for akkurat denne masteroppgåva.

Studien var dobbelblinda, randomisert og kontrollert. Prosjektet vart godkjent av regional komité for medisinsk og helsefagleg forskningsetikk, Sør-Ost Noreg og er gjennomført ut frå Helsinkideklarasjonen.

#### **3.1 Forsøkspersonar**

41 personar i alder 18 – 45 år gav samtykkje til å delta i studien etter å ha lest informasjonsskrivet (sjå vedlegg). Dei som møtte inklusjonskriteria og gav samtykkje til deltagning i studien, vart randomisert inn i éi av dei to suppleringsgruppene: Nativ Myse eller kontroll (lettmjølk).

*Tabell 2: inklusjons- og eksklusjonskriterier*

Inklusjonskriterier	Eksklusjonskriterier
18 – 45 år	Laktoseintoleranse eller mjølkeallergi
Ingen regelbunden styrketrening dei siste 6 månadar	Allergi mot lokalbedøving
Frisk – ingen skader i muskel-skjelettapparatet	Inntak av kosttilskot (kan delta dersom sluttar seinast 1 veke før testar startar)

Av dei 41 forsøkspersonane vart 24 personar (12 personar frå nativ myse-gruppa og 12 personar frå lettmjølk-gruppa) tilfeldig trekt ut til å delta i eit akutforsøk (sjå avsnitt

3.4: ”Akutforsøk”), to stykk i nativ myse-gruppa trakk seg undervegs og resultata er derfor frå 10 stk. i nativ myse- og 12 stk. i mjølkegruppa.

*Tabell 3: utgangsverdian for forsøkspersonar oppgitt som gjennomsnitt ( $\pm$  standardavvik). Det var ingen signifikante forskjellar mellom gruppene i nokon av parametrane.*

	Nativ myse (N=10)	Lettmjølk (N=12)
Alder	31,0 ( $\pm 6,1$ )	28,3 ( $\pm 5,9$ )
Vekt	78,1 ( $\pm 13,8$ )	81,7 ( $\pm 15,1$ )
BMI	24,4 ( $\pm 3,0$ )	25,7 ( $\pm 4,0$ )
Beinpress	279,0 ( $\pm 84,3$ )	282,3 ( $\pm 89$ )
Benkpress	66,3 ( $\pm 20,6$ )	57,6 ( $\pm 17,2$ )

### 3.2 Treningsintervasjonen

Treningsprogrammet som vart gjennomført er eit heilkroppsprogram (sjå vedlegg).

Treninga vart gjennomført 3 gonger per veke, 2 dagar i gruppe, under oppsyn av trenar, 1 dag aleine/i gruppe utan fast vegleiar, men med trenar til stades i rommet for konsultasjon/sikring/”spotting”. Programmet var basert på kontinuerleg progresjon – RM-økter. De fyrtre 3 vekene hadde forsøkspersonane 3 dagar med oppfylging, men frå og med veke 4 var det berre 2 dagar i veka med oppfylging og 1 dag utan fast trenar. 2 av dagane var satt av til RM-økter, 1 økt per veke var med submaksimal belastning.

### 3.3 Ernæring

Supplementet vart gitt i 2 x 20g dosar per dag med anten Nativ Myse eller lettmjølk i form av pulver (levert av TINE). Begge supplementa inneheldt lik del kaloriar og tilnærma lik fordeling av makronæringsstoffa (3,3% protein, 1,2% fett, 4,7% laktose og 2% sukrose). Nativ Myse inneholder 100% Myseprotein, medan lettmjølka inneholder 80% Kasein og 20% Myse. Forsøkspersonane vart bede om å ta supplementa morgon og kveld på treningsfrie dagar og etter treningsøkt og på morgen eller kveld på treningsdagar.

Tabell 4: Næringsinnhold og fordeling av aminosyre i supplementa

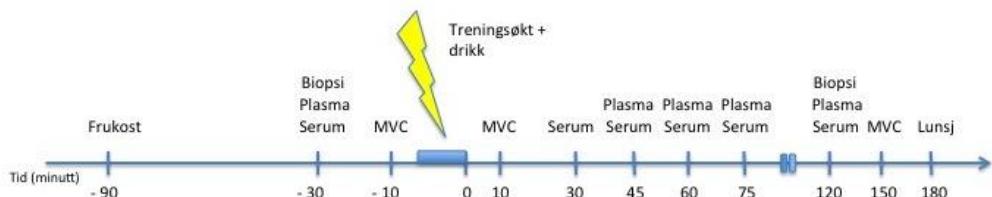
Aminosyrer (g/100g)	Lettmjølk (g/pose)	Nativ myse (g/pose)
Alanin	0,91	1,3
Arginin	0,89	0,8
Asparaginsyre	2,2	3,1
Cystein	0,22	0,7
Fenylalanin	1,3	1,2
Glutaminsyre	5,9	5,3
Glycin	0,53	0,5
Histidin	0,77	0,7
Isoleucin	1,4	1,6
Leucin	2,7 (1,9)	3,4 (2,5)
Lysin	2,3	2,8
Metionin	0,68	0,7
Prolin	2,7	1,8
Serin	1,5	1,4
Treonin	1,2	1,4
Tyrosin	1,2	1,0
Valin	1,8	1,6
Tryptofan	0,36	0,6
<b>Total protein</b>	<b>27,7 (19,1)</b>	<b>27,3 (20,0)</b>
<b>Feitt</b>	<b>10,0</b>	<b>10,3</b>
<b>Karbohydrat</b>	<b>51,6</b>	<b>57,1</b>
<b>Gram per pose</b>	<b>73</b>	<b>69</b>

### 3.4 Akuttforsøk

Av dei 41 forsøkspersonane som vart inkludert i studien, samtykka 24 (22) stk. til å delta i eit akuttforsøk. Akuttforsøk vart gjennomført før og etter treningsintervensjonen, i samsvar med dei ordinære pre- og posttestane. Forskjellen mellom ordinær pre- og posttesting og akuttforsøk var at akuttforsøka var meir omfattande og inkluderte totalt 4 biopsiar, to treningsøkter, MVC-testar og fleire veneprøvar fordelt på to dagar (før intervension og etter intervension). Hensikta med akuttforsøka var å kartlegga akutte endringar i anabole signalvegar og sjå om bildet endra seg etter treningsperioden. Før første akuttforsøk, hadde alle forsøkspersonane gjennomført tre treningsøkter med styrkeøvingane: to 1RM testar og éi 10RM-økt, og hadde såleis fått tilvenning til styrkeøvingane nytta i akuttforsøka.

Forsøkspersonane møtte fastande til akuttdagen. Ved oppmøte fekk dei ein standardisert frukost bestående av havregryn, vatn, olje, sukker og kanel. Mengda vart rekna ut basert på kroppsvekt. Direkte etter 10RM-økta fekk forsøkspersonane anten nativ myse (Prolacta®, Lactalis, Frankrike) eller lettmjølk (TINE SA). Mat for resten av akuttdagen og frukost neste dag var òg standardisert.

Som ein del av akuttforsøket, gjennomførte alle forsøkspersonane ei 10RM-treningsøkt ca. 30 minutt etter første biopsi. Økta bestod av seks øvingar; tre øvingar for overkropp og tre for bein. Det vart gjennomført tre sett per øving og ti repetisjonar per sett. På kvart tredje minutt starta eit nytt sett og økta varte i 51 minutt. Motstand vart rekna ut frå tidlegare 1RM-testar. Dersom vekta var for låg/høg, vart den justert på neste sett slik at det var så nære 10RM som mogleg. Målet med økta var å oppnå stor belastning på muskelskjelettapparatet og dermed auka aktivitet i intracellulære signalvegar for seinare analysar.



Figur 5: Tidslinje for akuttdag

## **3.5 Målingar**

### **3.5.1 Maksimal volontør kontraksjon (MVC) og 1RM-tester**

MVC vart målt i knestrekkarane og visar endringar i muskelstyrke og hastigkeit på kraftutvikling (RFD). 1 repetisjon maksimum (1RM) vart målt i benkpress i Smithmaskin og beinpress, og viser endringar i muskelstyrke. MVC- og 1RM-testane pre intervension vart gjennomført ved to anledningar for å sikra reliable resultat, og unngå ”tilvenningseffekten”. Etter intervension vart det gjennomført ein test per parameter. Dette vart grunna med at treningsprogrammet som gjekk over 12 veker bestod av både benkpress og beinpress og øvingane burde derfor vera godt kjente for forsøkspersonane.

### **3.5.2 Muskelbiopsiar**

Biopsiar vart tekne av m. Vastus Lateralis ved laboratoriet på Norges idrettshøgskole på begge akuttdagane: 30 minuttar før treningsøkt og to timer etter treningsøkt. Det vart sett lokalbedøving i hud og muskelfasien (xylocain med adrenalin, 10mg/ml + 5 µg/ml) etter ein vask med klorhexidin. Eit 1 cm brent snitt vart laga i huda og muskelfasien, og to til tre bitar vart tekne ut, slik at total mengde utgjorde ca. 150 mg. Det vart nytta ei 6 mm Bergstrømnål og vakuumpumpe for å suga inn muskelvev. Kutta vart tekne først distalt, deretter proksimalt for å unngå kutting frå same område. Bitane vart delt i mindre bitar, derav ca. 50 mg til ”mine” Western Blot-analysar. Deretter vart dei fryst i flytande nitrogen og oppbevare i -80°C før vidare analysar.

Akutt-studien vart gjennomført med det føremål å sjå på grad av fosforylering hjå signalprotein, og vart analysert med Western Blot. Proteina som vart analysert, var p70S6K, 4E-BP1 og eEF2.

### **3.5.3 Andre målingar**

I tillegg til MVC, 1RM-test og muskelbiopsiar, vart det teke ultralyd av m. vastus lateralis og dual x-ray absorptiometry (DXA) før og etter treningsintervasjon. Resultat frå DXA og ultralyd vil utelukkande nyttast for å studera overføringsverdien av intracellulær signalering til muskelvekst og styrke, og derfor ikkje verte vidare utgreidd her.

## **3.6 Analysar**

### **3.6.1 Homogenisering**

Prøvar vart henta i frysen (-80°C) og lagt på is. Muskelvevet vart vegd ved biopsitakinga og delt opp i bitar på rundt 50 mg. Den eksakte vekta spela ikkje så stor rolle då proteinmålingar vart gjort i etterkant. Kvar muskelbit vart tilsett 1 ml T-PER ® (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), 20 µl Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) og 20 µl EDTA (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Muskelbitane vart homogenisert i to-tre omgangar á 5 sek. Deretter vart homogenatet lagt til risting i kjøleskap i 30 minutt. Etter 30 minutt med risting, vart prøvane sentrifugert på 10 000 x G i 10 minuttar ved 4°C. Supernatanten vart overført til dei ferdigmerka 1,5 ml-røyra. Aliquottar á 25 µl vart fordelt i 10 stk. mikrorøyr. Alle prøvane vart fryst ned til -80°C.

### **3.6.2 Proteinmåling**

Totalt proteininnhald vart målt ved RC/DC Protein Assay kit (BioRad, cat. no. 5000121, Herkules, CA, USA). Bovine γ-globulin vart brukt for å danna ei standardkurve for kvar 96-brønnars plate; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5 µg/ml. For å få proteinkonsentrasjonen i målingane innanfor spennet mellom øvre og nedre verdi i standardkruven, vart homogenatet fortynna 1:4 (15 µl dH<sub>2</sub>O + 5 µl prøve). På kvar 96-brønnars plate vart det teke med to kontrollar, som var ei blanding av to standardarar. Etter pipettering av 5 µl dH<sub>2</sub>O, standardarar, prøvar eller kontroll per brønn, vart 25 µl A+S reagens (kat.nr. #500-0113 og #500-0115, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) tilsett kvar brønn, deretter 200 µl reagens B per brønn (kat.nr. #500-0114, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Etter 15 minutt inkubering, vart plata avlest ved 690 nm i KIM Immunochemical Processing Software 32. Proteinkonsentrasjonane var berekna ut ifrå standardane.

### **3.6.3 Western Blot**

Elektroforese og Western Blot av muskelhomogenat ble utført med precast TGX Stain Free geler (4-20% polyacrylamide): BioRad-systemet. For fullstendig protokoll, sjå vedlegg.

Proteinkonsentrasjon nytta i analysane var 35 ug, kvar brønn vart ”loada” med 30 ul. Nokre omgangar vart køyrd med 50% eller 100% auke i proteinkonsentrasjon grunna svake signal for p70S6K pre akuttøkt. Dette vart justert for når resultata var klare.

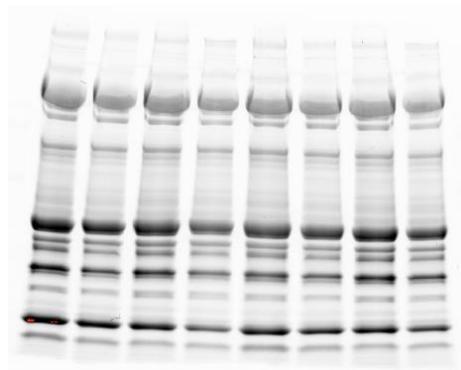
Homogenatet vart tilsett sample buffer (1/25 5M DTT (dithiothreitol, kat.nr.#161-0610, Bio-Rad Laboratories Inc.) + 24/25 Laemmli (4x Laemmli Sample Buffer, kat.nr. #161-0747, Bio-Rad Laboratories Inc.)) og dH<sub>2</sub>O ut ifrå ”sample preparation mal” slik at proteinkonsentrasjonen vart lik i alle prøvane. Proteina vart denaturert<sup>3</sup> på 70°C i 10 min på varmeblokk. Prøvane vart applisert som duplikat for kvart biopsitidspunkt i Stain Free-gelar (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gels, Kat.nr.#456-8094, Bio-Rad Laboratories Inc.) ilag med 5 µl vektmarkør (Protein Ladder PS 11, kat.nr.#310005, GeneOn).

Elektroforesen vart køyrd på 200 volt i 41 minutt (Mini PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad), eller til 10,5 kDa-markøren hadde vandra ut av gelen. Elektroforesen vart køyrd så lenge for å få separert proteina mest mogleg ettersom p70S6K og eEF2 ligg nære kvarandre (på høvesvis 70 og 95 kDa) utan at det gjekk på kostnad av 4E-BP1 (14-22 kDa).

Etter enda elektroforese, vart gelane teke bilete av i Bio-Rad ChemiDoc™ MP System (#170-8280, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for å kontrollera loading av protein. Gelane vart eksponert for UV-lys i 2,5 minutt for aktivering av aminosyra Tryptofan. Samstundes vart PVDF-membranane (kat.nr.#162-0177, Bio-Rad, CA, USA) aktivert, først 30 sekund i metanol (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), deretter 30 sekund i dH<sub>2</sub>O, 2 minutt i nytt dH<sub>2</sub>O og til slutt 15 minuttar i transferbuffer.

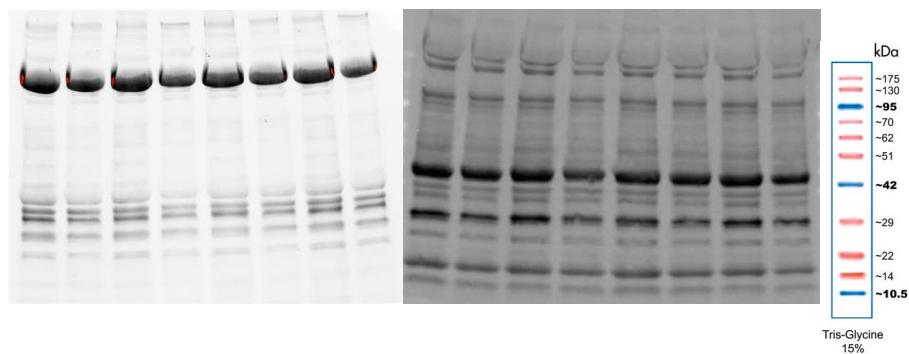
---

<sup>3</sup> denaturering = peptidkjeda foldar seg ut og endrar struktur slik at protein kan separerast etter molekylvekt i elektroforesen



*Figur 6: Gel etter elektroforese*

”Sandwichen” vart sett saman av pads, filterpapir (Criterion™ blotter Filter paper, kat.nr. #1704085, Bio-Rad Laboratories Inc.), PVDF-membranar og gelar. Transferbuffer, fryseelement og magnetrørrepinne vart lagt i blottekammeret ilag med den ferdigmonterte sandwichen. Blottinga føregjekk ved 100 volt i 30 minuttar. Både gelane og membranane vart tekne bilete av etter blottinga for å kontrollere at proteina hadde blitt overført frå gel til membran.



*Figur 7: gel (t.v.) og membran (midt) etter endt blotting. Markørvekt (t.h.) nytta til å identifisera protein etter vekt (kDa).*

Membranane vart blokka i 5% mjølkeløysing (Skim milk powder (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) + TBS-T) i to timer ved svak risting i romtemperatur.

Deretter vart membranane kutta ut ifrå proteina 4E-BP1 (14-22 kDa), p70S6K (70 kDa) og eEF2 (95 kDa), og lagt i sine respektive antistoff i kjøleskap over natt (sjå tabell 5).

Neste dag byrja med vasking av membranane, for så å inkubera dei i sekundært antistoff i éin time ved svak risting i romtemperatur. Deretter vart vaskeprosessen gjenteke, før deteksjon av proteina kunne starta. Membranane ”bada” i Chemiluminescene Substrate SuperSignal® WestDura (Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, kat.nr.#34076, Rockford, IL, USA). Bileta vart tekne med Bio-Rad ChemiDoc™ MP System (#170-8280, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) og behandla og analysert med Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Etter gjennomgang og godkjenning av biletene, vart membranane strippa i 10 minutt med Restore™ Western Blot Stripping Buffer (kat.nr.#21059, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Deretter ein ny runde med vasking og blokkering i 5% mjølkeløysing i to timer. Prosessen vidare tilsvasar prosessen for første dag med inkubering i primært antistoff (men for total mengde 4E-BP1, p70 og eEF2) over natt og så vidare...

*Tabell 5: oversikt over primær- og sekundærantistoffa som vart nytta i analysane*

<b>Antistoff</b>	<b>Produsent</b>	<b>Vertsdyr</b>	<b>Fortynning</b>	<b>Kat.nr.</b>
P70S6 kinase	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#8209
Phospho-p70S6K (Thr389)	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#8209
eEF2	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#2332
Phospho-eEF2 (Thr56)	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#2331
4E-BP1	Cell Signaling	Kanin	1:5000	#9452
Phospho-4E-BP1 (Thr70)	Cell Signaling	Kanin	1:5000	#9455
Anti-rabbit IgG HRP-linked AB	Cell Signaling	Geit	1:3000	#7074

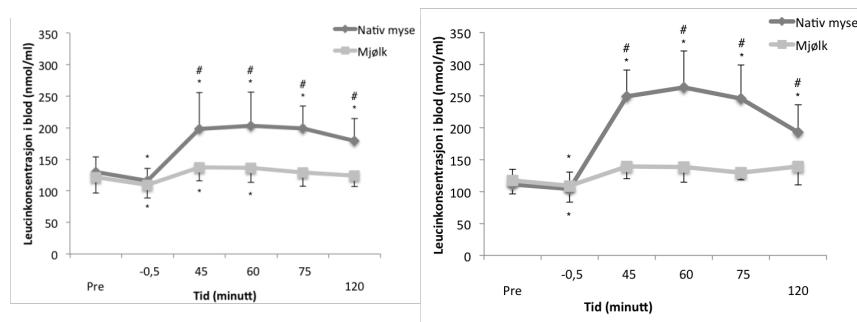
### **3.7 Statistikk**

Data er presentert med gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik ( $\pm$ SD). Students t-test for upara utval vart utført på antropometriske data for å kontrollera at utvala var tilnærma homogene (tabell 3). Endringar i muskelstyrke frå før til etter intervension, målt i benkpress og beinpress, vart analysert med para t-test for både Nativ myse- og mjølkegruppa, medan endringar frå før til etter intervension mellom gruppene vart analysert med upara t-test. Endring i fosforylering av 4E-BP1 før og etter treningsøkt og mellom gruppene vart analysert ved hjelp av t-test for høvesvis para og upara utval. Prosentvis endring i p-p70S6k vart logtransformert og deretter køyrd gjennom t-test for å undersøka forskjellar mellom tidspunkt og grupper. Data for p70S6k er likevel presentert i resultatkapittelet som prosent-endring. Prosentvis endring i p-eEF2 var ikkje normalfordelt og dei ikkje-parametriske testane Wilcoxon-test og Mann-Whitney U-test vart nytta. Korrelasjonskoefisienten Pearsons r og P-verdi var nytta for å studera forholdet mellom endring i fosforylering hjå eEF2, 4E-BP1 og p70S6k og endringar i muskeltjukn i m. vastus lateralis, total muskelmasse (LBM), muskelmasse i bein (LLM) og beinstyrke (1RM i beinpress). Signifikans nivå vart sett til  $P \leq 0,05$  for samlege testar. Verdiar definert som ”outliers” låg minimum 3 standardavvik utanfor gjennomsnittet. Desse verdiane vart ekskludert frå analysane. Også der det manglar ein posttest i f.eks. 1RM beinpress, vert forsøkspersonen ekskludert frå alle analysane der 1RM i beinpress inngår. All statistikk vart utført i Microsoft® Excel® 2011 og Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 4. Resultat

### 4.1 Leucinkonsentrasjon i blod/plasma

Leucinkonsentrasjonen i blod vart målt før og etter trenings- og supplementeringsintversjonen. Det vart teke måling før treningsøkt, direkte etter økt/rett før proteininntak (-0,5) og i timane etter proteininntaket (45, 60, 75 og 120 minutt etter inntak). Begge gruppene viste signifikant reduksjon i leucinkonsentrasjon direkte etter treningsøkt ved begge testdagane ( $p < 0,05$ ). Før intervensionen viste nativ myse-gruppa signifikant auke i leucinkonsentrasjon ved alle tidspunkt etter proteininntak ( $p < 0,05$ ), medan mjølkegruppa hadde signifikant auke etter 45 og 60 minutt ( $p < 0,05$ ). Det var signifikant forskjell mellom gruppene ved 45, 60, 75 og 120 minutt etter proteininntak ( $p < 0,05$ ). Etter intervensionen viste mjølkegruppa ingen endring i leucinkonsentrasjon frå pre til 45, 60, 75 og 120 minutt etter inntak. Nativ myse-gruppa hadde signifikant auke i konsentrasjon 45, 60, 75 og 120 minutt etter inntak ( $p < 0,05$ ) og alle desse tidspunktene var forskjellige frå mjølkegruppa ( $p < 0,05$ ).



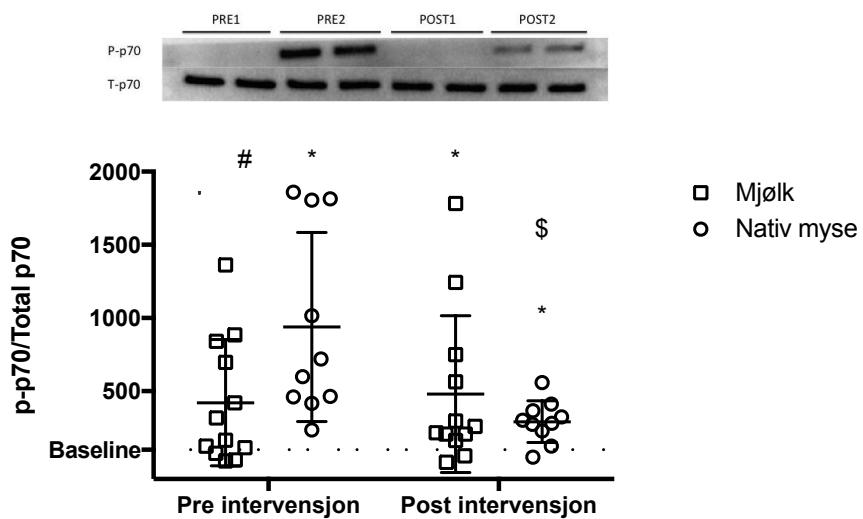
Figur 8: leucinkonsentrasjon i blod før (t.v.) og etter (t.h.) treningsintervasjonen. Tidspunkt "pre" er før sjølv treningsøkta. "-0,5" er tidspunktet direkte etter treningsøkta og rett før proteininntak. \*: signifikant forskjell frå pre innanfor same supplementeringsgruppe, #: signifikant forskjell mellom gruppene på same tidspunkt.

## 4.2 Intracellulær signalering

### 4.2.1 p70S6K

Før treningsintervasjonen, vart det observert signifikant auke i ratio mellom fosforylert p70S6k (Thr389) og total p70S6k frå før til etter akuttøkt i nativ myse-gruppa ( $p < 0,05$ ), men ikkje for mjølkegruppa ( $p > 0,05$ ). I tillegg hadde nativ myse-gruppa signifikant større grad av fosforylering enn mjølkegruppa ( $p < 0,05$ ).

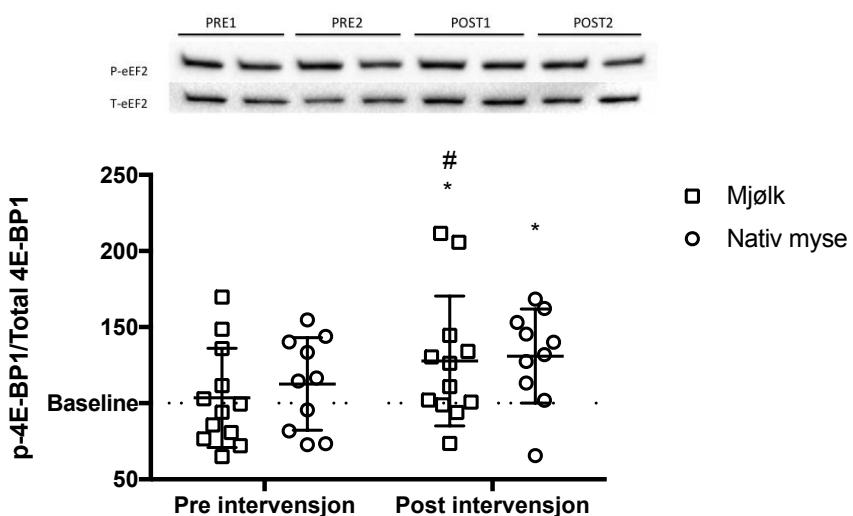
Etter intervasjonen fant me signifikant forskjell frå før til etter akuttøkt for både mjølkegruppa ( $p < 0,05$ ) og nativ myse-gruppa ( $p < 0,05$ ). Det viste seg at gruppa som hadde inntekte nativ myse, hadde minka signifikant i ratio p-p70S6k/t-p70S6k frå før til etter treningsintervasjon ( $p < 0,001$ ). Denne endringa vart ikkje observert i mjøllegruppa. Det var ingen forskjellar i aktivering av p70S6k mellom gruppene under treningsøkta utført etter intervasjon.



Figur 9: individuelle data for ratio mellom fosforylert p70S6k og total p70S6k. Over er representative Western Blot-band på p70S6k for høvesvis fosforylert og total protein. \*: signifikant forskjell frå baseline til etter akuttøkt ( $p < 0,05$ ), §: signifikant forskjell frå før til etter treningsintervensjon innanfor same supplementsgruppe ( $p < 0,05$ ), #: signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) mellom supplementsgruppene på same tidspunkt.

#### 4.2.2 4E-BP1

Ratio mellom fosforylert 4E-BP1 (Thr70) og total 4E-BP1 var ikke signifikant forskjellig fra baseline til etter akuttøkt gjennomført før intervension for verken nativ myse eller mjølk. I treningsøkta gjennomført etter styrketreningsintervensjonen var det signifikant auka fosforylering for begge gruppene ( $P < 0,05$ ). Auken i aktivering fra før til etter treningsintervasjon var signifikant for mjølkegruppa, men den var ikke signifikant i nativ myse-gruppa. Det var likevel ingen signifikante forskjellar mellom gruppene på noko tidspunkt.

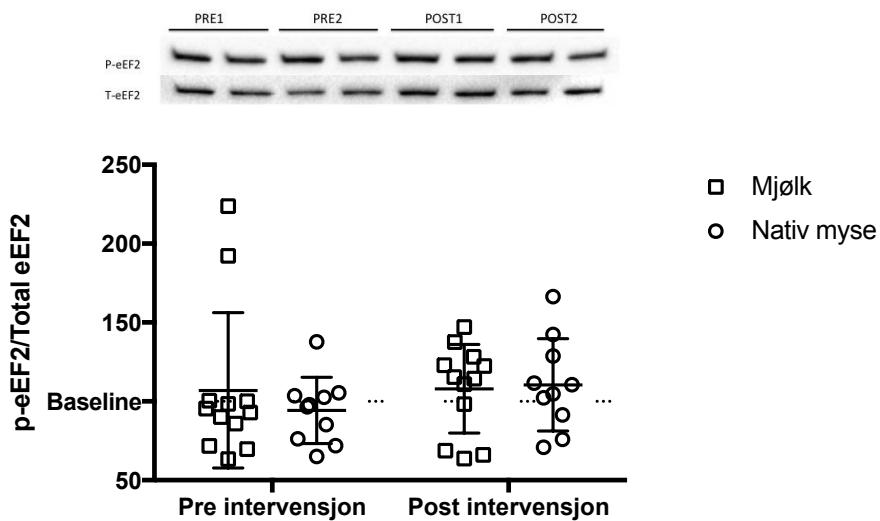


Figur 10: individuelle data for ratio mellom fosforylert 4E-BP1 og total 4E-BP1. Over er representative Western Blot-band på 4E-BP1 for høvesvis fosforylert og total protein. \*: signifikant forskjell fra baseline til etter akuttøkt ( $p < 0,05$ ), #: signifikant forskjell fra før til etter treningsintervasjon innanfor same supplementsgruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 eEF2

Ratio av fosforylert eEF2 (Thr56) i forhold til total eEF2 endra seg ikke signifikant fra baseline verken før eller etter treningsintervasjon. Statistiske testar avslørte heller ingen signifikante endringar i fosforylering av eEF2 mellom gruppene på noko som helst tidspunkt. To av forsøkspersonane i mjøkegruppa viste stor auke i fosforylering

av eEF2 etter første akuttøkt i motsetnad til resten av gruppa, men desse er ikke statistiske uteliggjarar.



*Figur 11: individuelle data for ratio mellom fosforylert eEF2 og total eEF2. Øvst er eit representativt eksempel på Western Blot-band for eEF2, både fosforylerte og total protein. To parallellelar vart analysert for kvart tidspunkt.*

#### 4.3 Total protein

Total mengde av eEF2, 4E-BP1 og p70S6k vart analysert i forhold til total mengde protein (målt på membran etter blotting). Her var det ingen signifikante endringar for nokon av proteina og ingen av tidspunkta.

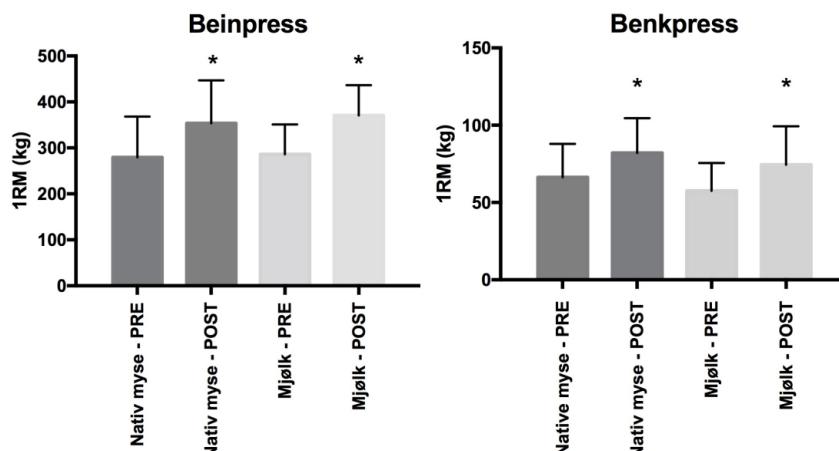
#### 4.4 Korrelasjonar

Korrelasjonar vart gjort for p70S6k, eEF2 og 4E-BP1, mot prosentvis og absolutt endring i total muskelmasse (målt som lean body mass), muskelmasse i bein (lean leg mass), tjukn, tverrsnitt og volum av m. vastus lateralis og 1RM i beinpress. Det var

signifikant negativ korrelasjon ( $P < 0,05$ ) mellom endring i fosforyleringsstatus for 4E-BP1 og endring i muskelmasse (LBM) i mjølkegruppa (Pearsons  $r = -0,67$ ). Det var signifikant negativ korrelasjon ( $P < 0,05$ ) mellom fosforylering av 4E-BP1 før treningsintervensjon og både prosentvis ( $r = -0,45$ ) og absolutt ( $r = -0,56$ ) auke i muskelmasse i bein (LLM). Fosforylering av 4E-BP1 før treningsintervensjon var også signifikant negativ korrelert med prosentvis auke i tjukn av m. vastus lateralis over ein 11-vekers treningsperiode ( $r = -0,46$ ). Elles var det ingen signifikante korrelasjonar mellom nokon av signalproteina og dei antropometriske måla.

#### 4.5 Muskelstyrke (1RM)

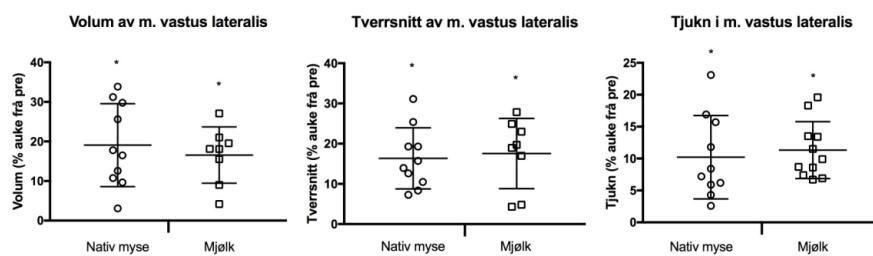
Det var signifikant auke i 1RM frå før intervension til etter intervension i både benkpress og beinpress for begge gruppene ( $P < 0,01$ ). Det var derimot ingen forskjell mellom gruppene i endring i 1RM i nokon av øvingane ( $P > 0,05$ ).



Figur 12: Gjennomsnittleg auke i 1RM for beinpress (t.v.) og benkpress (t.h.). \*: signifikant auke samanlikna med pre-intervensjon innanfor same suplementeringsgruppe

## 4.6 Hypertrofi i m. Vastus Lateralis

Det var ei signifikant auke i tjukn i m. vastus lateralis frå før til etter treningsintervensjon hjå begge gruppene, men det var ingen forskjell i endring mellom gruppene. Heller ikkje største tverrsnitt eller volum av m. vastus lateralis var forskjellig mellom nativ myse og mjølk, sjølv om begge auka signifikant frå før til etter treningsintervensjon.



Figur 13: Individuelle data for volum ( $\text{cm}^3$ ), tverrsnitt ( $\text{cm}^2$ ) og tjukn (cm) i m. vastus lateralis. \*: signifikant auke frå utgangsverdi innanfor same supplereringsgruppe.

## **5. Diskusjon**

Hovudhensikta med denne studien var å undersøkja akutt aktivering av signalproteina p70S6k, eEF2 og 4E-BP1 hjå yngre, utrente før og etter ein 12-vekers styrketrenings- og suppleringsintervensjon med anten nativ myse eller lettmjølk. Etter første akutte treningsøkt og påfølgjande proteininntak, auka fosforylering av p70S6k i nativ myse-gruppa, og auken i fosforylering var signifikant høgare enn i mjølkegruppa. For både eEF2 og 4E-BP1 var det ingen endring i fosforylering etter første akuttøkt for nokon av gruppene. Andre akuttøkt vart gjennomført etter trenings- og suppleringsintervensjonen, og p70S6k var signifikant auka frå før til etter akuttøkt hjå begge grupper, men mysegruppa viste signifikant lågare grad av fosforylering etter intervension samanlikna med før intervension. Fosforylert 4E-BP1 auka signifikant frå før til etter andre akuttøkt i begge grupper, men det var berre mjølkegruppa som hadde signifikant auke frå før til etter intervension. For eEF2 var det framleis ingen endring i fosforylering. Begge gruppene auka 1RM i beinpress og benkpress, i tillegg auka tverrsnitt, volum og tjukn av m. vastus lateralis, men det var ingen signifikante forskjellar mellom gruppene.

### **5.1 Leucinkonsentrasjon og intracellulær signaling**

Leucinkonsentrasjonen auka meir ved inntak av nativ myse samanlikna med inntak av mjølk både før og etter trenings- og suppleringsintervensjonen. Dermed var føresetnaden for hypotesen oppfylt og me kunne vidare studera korleis dette påverka signaling og til slutt treningsadaptasjonar.

#### **5.1.1 Status: utrent**

Leucinkonsentrasjonen i blod auka 45 og 60 minutt etter proteininntak for både nativ myse- og mjølkegruppa. Nativ myse-gruppa hadde òg signifikant auka konsentrasjon av leucin 75 og 120 minutt etter inntak, og alle tidspunkta frå 45 til 120 minutt hadde nativ myse signifikant høgare konsentrasjon av leucin samanlikna med mjølkegruppa. Fosforylering av eEF2 og 4E-BP1 endra seg ikkje frå baseline til etter første akuttøkt, medan fosforylert p70S6k auka signifikant hjå gruppa som inntok nativ myse. p70S6k i nativ myse-gruppa hadde signifikant større grad av fosforylering enn mjølkegruppa.

### **p70S6k**

p70S6k-aktivering etter første akuttøkt er i samsvar med det andre studiar finn hjå unrente eller personar som ikkje trenar regelmessig styrketrening (Dreyer et al., 2008; 2010; Drummond et al., 2008; Moore et al., 2011). Moore og medarbeidrarar (2011) og Drummond og medarbeidrarar (2008) brukte høvesvis 25g myse og 20g EAA i sine studiar, medan Dreyer og medarbeidrarar (2010) ikkje inkluderte protein supplement i sin studie. Dreyer og medarbeidrarar (2008) samanlikna EAA beståande av 35% leucin og karbohydrat med ei kontrollgruppe som ikkje fekk supplement etter éi treningsøkt. Begge gruppene auka p-p70S6k, men to timer etter treningsøkt og 1 time etter næringsinntak, hadde p-p70S6k auka signifikant meir i EAA+KH-gruppa i forhold til kontrollgruppa. Ut ifrå desse studiane ser det ut til at auka aktivering av p70S6k er ein fylgle av treningsstimuli og proteininntak og dersom begge stimuliane vert kombinert, skjer ein ytterlegare aktivering.

Den signifikante forskjellen i p70S6k-fosforylering mellom nativ myse- og mjølkegruppa etter første akuttøkt kan skuldast forskjellar i leucininnhald i nativ myse og mjølk på høvesvis 2,5g og 1,9g per dose (tabell 4). > 2g leucin ser ut til å trægga protein syntesen (Nongonierma & FitzGerald, 2015), men dersom det vert inntekne store nok dosar ( $\geq 20\text{g}$ ) med protein av høg kvalitet<sup>4</sup>, til dømes myse, ser det ikkje ut til at ekstra mengde leucin stimulerer protein syntesen ytterlegare (Tipton et al., 2009). Det vil vera delvis samsvar mellom respons i protein syntese og fosforylering av p70S6k, men truleg kan ein finna forskjellar i p-p70S6k utan at desse forskjellane vert gjenspeglia i protein syntesen (Crozier et al., 2005). I vår studie fekk forsøkspersonane  $\sim 20\text{g}$  protein. Det er derfor rimeleg å anta at proteindosane forsøkspersonane i vårt prosjekt fekk var tilstrekkelege for å maksimalisera stimulering av protein syntesen og dermed kanskje også anabole signalvegar, og at auka leucininnhald åleine ikkje nødvendigvis kan forklara kvifor det var forskjell mellom nativ myse og mjølk. Som nemnt består mjølkeprotein av 80% kasein og 20% myse. Kaseinar vert fordøya langsamare enn myseprotein fordi kaseinar klottar seg til ein kompakt masse i magesekken og aminosyrestroymen til blodet vert meir gradvis og langvarig, som vist i studien til Reitelseder og medarbeidrarar (2011). Dei fann signifikant lågare [EAA] og [leucin] i blod ved inntak

---

<sup>4</sup> Protein av høg kvalitet er protein med stor andel essensielle aminosyrer og som vert fordøya relativt raskt og dermed har ein høg DIAAS – Digestible Indispensable Amino Acid Score.

av kasein (~1,5g leucin), samanlikna med myseprotein (~2g leucin) i timane etter styrketrening og proteininntak (Reitelseder et al., 2011). Dette kan resultera i lågare p70S6k-respons, men det var ikkje tilfelle. P-p70S6k auka for både myse- og kaseingruppa etter 60 og 210 minutt etter inntak, utan at det var forskjellar mellom proteinsupplementa (Reitelseder et al., 2011). Truleg kan den manglande p-p70S6k-responsen i mjølkegruppa tilskrivast treig fordøyning av kaseinar samanlikna med myseprotein og at maksimal fosforylering av p70S6k i mjølkegruppa ikkje var nådd to timer etter inntak.

#### **4E-BP1**

Auka fosforylering av p70S6k er eit resultat av aktivert mTOR, som ligg oppstraums for p70S6k. Aktivert mTOR kan òg fosforylera 4E-BP1. Me fann likevel ingen signifikant auke i fosforylering av 4E-BP1 to timer etter treningsøkta. Andre studiar som har målt fosforylering av 4E-BP1 er ikkje eintydige i sine resultat. Nokre studiar finn auka p-4E-BP1 éin, to, tre, fire og fem timer etter trening og proteininntak (Churchward-Venne et al., 2014; Churchward-Venne, Burd, Mitchell, West, et al., 2012b; Dickinson et al., 2014; Moore et al., 2011; Reidy et al., 2013), medan andre finn ingen endring i p-4E-BP1 éin, tre, fire, fem, seks, sju og tolv timer etter trening og proteininntak (Areta et al., 2013; Churchward-Venne et al., 2014; C. J. Mitchell et al., 2014; Reitelseder et al., 2011; West et al., 2011). Av studiane som fann auka 4E-BP1 var alltid styrketrening og proteininntak kombinert, medan nokre av studiane som ikkje fann endring i p-4E-BP1 nytta protein åleine (Churchward-Venne et al., 2014) eller styrketrening åleine (Dreyer et al., 2008) som stimuli. Det kan derfor vera mogleg at det krev eit sterkare stimuli for å aktivera 4E-BP1. På den andre sida, er det fleire studiar som ikkje har funne noko endring i 4E-BP1, som likevel har kombinert styrketrening og proteininntak (Areta et al., 2013; C. J. Mitchell et al., 2014; Reitelseder et al., 2011; West et al., 2011). Alle desse fire studiane har til felles at biopsiane deira vart tekne anten innan 1 time etter styrketreningsøkta og proteininntaket eller seinare enn tre timer etter. Det er altså eit tidsrom mellom éin og tre timer der det ikkje er målingar, og utifrå figur 3 ser det ut til at fosforylering av 4E-BP1 skjer mellom éin og tre timer. Det har òg blitt funne auka fosforylering av 4E-BP1 90 minutt etter inntak av protein (W. K. Mitchell et al., 2015b). Alle desse funna, sett i samanheng, gjer det vanskeleg å seia noko konkret om akkurat kva respons av trening og proteininntak ein kan forventa i fosforylering av 4E-BP1.

Truleg er det ingen fasit, men veldig avhengig av kva stimuli som vert gitt, korleis kvart individ respondera, størrelse på utval og som nemnt tidlegare: biopsitidspunkt.

Tidlegare studiar har, i likskap med oss, samanlikna ulike mjølkeprotein (Reidy et al., 2013; Reitelseder et al., 2011). Reidy og medarbeidarar (2013) samanlikna myseprotein med ein proteinblanding beståande av 50% kasein, 25% myse og 25% soya. Dei fann auka fosforylering av 4E-BP1 to og fire timer etter proteininntak i begge grupper, utan noko forskjell mellom proteinsupplementa. Reitelseder og medarbeidarar (2011) samanlikna myseprotein og kaseinar, og fann at fosforylering av 4E-BP1 mot total 4E-BP1 var signifikant forskjellig mellom proteinsupplementa 1, 3,5 og 6 timer etter inntak, i favør kasein>myse. Ettersom kasein tar lenger tid å fordøya, kan det tenkast at desse biopsitidspunkta er i favør kasein, og ikkje myse som vert fordøydd raskare. Proteinsupplementa i vår studie bestod av anten nativ myse (100% myseprotein) eller mjølk (80% kasein, 20% myse) og biopsi vart tatt 2 timer etter trening og inntak som, i teorien, skulle vera fordel myse med tanke på fordøyingshastigkeit. I tillegg var forsøkspersonane i dei to føregåande studiane, og i dei fleste andre akuttstudiar for den saks skuld, fastande, medan forsøkspersonane i vår studie åt frukost før treningsøkta og proteininntaket. Eit inntak av protein vil auka tilgjengelegeita av aminosyrer i blod og kunne aktivera anabole signalvegar og potensielt auka fosforylering av 4E-BP1, slik at når vår kvile-biopsi vert teke er basalnivået forhøgja samanlikna med fastande basalnivå. Dermed vil endringane frå basal til etter treningsøkt vera mindre og potensielt vanskelegare å oppdaga. Dette kan sjølv sagt vera ein medverkande årsak til å me ikkje fann noko endring i p-4E-BP1 frå baseline.

Me har målt fosforylering av 4E-BP1 på bindingssete Thr70, i motsetnad til dei fleste andre studiar. Dei fleste studiane referert til her målar fosforylering på Thr37/46 (Arete et al., 2013; Dreyer et al., 2008; 2010; Drummond et al., 2008; Farnfield et al., 2012; Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009b; Moore et al., 2011; Reidy et al., 2013; West et al., 2011) medan éin målar fosforylering på Ser65/Thr70 (W. K. Mitchell et al., 2015b). mTOR fosforylera Thr37/46 (Gingras et al., 1999). For å oppnå dissosiasjon av 4E-BP1 frå eIF4E må fleire bindingseter fosforylerast (Gingras et al., 1999), kor fosforylering av Thr70 og Ser65 er siste steg i denne fosforyleringskaskaden. Det vert poengtert at fosforylering av alle desse fire bindingssetene er kritiske for full inaktivering av 4E-BP1

(Hay & Sonenberg, 2004). Derfor meinar me at måling av fosforylering på Thr70 er ein god indikator på (full) inaktivering av 4E-BP1

### **eEF2**

Fosforylering av eEF2 endra seg ikkje frå før til etter treningsøkta for nokon av gruppene. eEF2 ligg nedstraums for p70S6k og ettersom p70S6k var fosforylert to timer etter treningsøkta, stemmer det, ut ifrå teorien, at ikkje eEF2 endra seg signifikanrt ved same tidspunkt.

I forskinga er det rapportert om forskjellige funn. Nokon, i likskap med oss, finn ikkje endring i fosforylering av eEF2 (Areta et al., 2013; Churchward-Venne et al., 2014; Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009b; Moore et al., 2011), medan andre finn redusert fosforylering av eEF2 (Camera et al., 2015; Dickinson et al., 2014; Fujita et al., 2007) som fylgje av ei styrketreningsøkt og/eller proteininntak (Camera et al., 2015; Dickinson et al., 2014). Det er ingen samanheng mellom styrketreningsøktene i dei ulike studiane og respons på p-eEF2, men det ser ut til at styrketrening per se kan påverka fosforylering av eEF2 i retning av redusert p-eEF2 (Camera et al., 2015; Moore et al., 2011). I mangel på treningsstimuli kan proteininntak per se påverka fosforylering av eEF2 hjå unge (Fujita et al., 2007). Tidspunkt for biopsitaking vil òg vera ein bestemmande faktor for resultatet. I vår studie vart biopsiane teke rett før og to timer etter treningsøkt og proteininntak. Studiane som har funne redusert p-eEF2 har biopsiar 1, 2, 3 og 6 timer etter treningsøkt. Studiane som ikkje har funne noko forskjell har biopsiar frå 1, 1,5, 3, 4 og 4,5 timer etter treningsøkt. Det kan tenkjast at det vil vera individuelle forskjellar som spelar inn, men at optimalt tidspunkt for biopsitaking ligg ein plass mellom 1,5 og 3 timer. Dersom dette stemmer, burde me funne redusert fosforylering av eEF2 i vår studie, noko me ikkje fann. Som nemnt tidlegare vert redusert fosforylering av eEF2 sett i samanheng med auka fosforylering av p70S6k, då p70S6k ligg oppstraums for eEF2 (figur 1). Ettersom me fann auka p-p70S6k to timer etter treningsøkta er det sannsynleg at signalet ikkje har nådd eEF2 ved same tidspunkt og at det kan forklara kvifor me ikkje finn noko endring i p-eEF2. Det er vesentleg at ein biopsi visar kva som skjer i akkurat den augneblinken prøven vert teke og ikkje reflektera det som skjer i tida før eller etter biopsien. Det kan derfor vera mogleg at to timer etter treningsøkta er for tidleg til å oppdaga endringar i p-eEF2 ettersom det er tilnærma optimalt tidspunkt for å oppdaga forskjellar i p70S6k hjå utrente. I likskap

med oss, har alle studiane referert til i dette avsnittet målt aktivitet på bindingssetet Thr56.

Dersom ein ser på resultata (figur 11), så er det to stykk i mjølkegruppa som tydeleg skil seg frå resten ved å ligga på rundt 200% auka fosforylering. Ved å sjå vekk frå desse, vert det tydeleg at alle forsøkspersonane ligg på baseline eller under. Desse er per definisjon ikkje statistiske uteliggjarar<sup>5</sup> og derfor har me valt å inkludera dei. Det kan tenkast at verdiane, analysert ved bruk av Western blot, faktisk ikkje stemmer. Western blot har sine svakheiter ved at det er mange steg og små endringar i nokre av desse stega kan vera alt som skal til for å oppnå eit litt anna sluttresultat.

### 5.1.2 Status: trena

Etter trenings- og suppleringsintervensjonen var leucinkonsentrasjonen i blod auka utelukkande for nativ myse-gruppa (45, 60, 75 og 120 minutt) etter proteininntak. I mjølkegruppa var det ingen endring, bortsett frå ein reduksjon direkte etter økta og rett før proteininntak, tilsvarende reduksjonen i nativ myse-gruppa. Nativ myse viste signifikant større [leucin] i blod enn mjølkegruppa 45, 60, 75 og 120 minutt etter proteininntak. To timer etter andre akuttøkt viste begge gruppene signifikant auka fosforylering av p70S6k og 4E-BP1, men nativ myse hadde signifikant lågare grad av p-p70S6k samanlikna med første akuttøkt. Mjølkegruppa viste signifikant auka fosforylering av 4E-BP1 frå første til andre akuttøkt. I samsvar med første akuttøkt, vart det ikkje målt noko endring i fosforylert eEF2.

Det er få studiar som har studert effekten av styrketrening og proteininntak over lengre tid på akutt anabol signalering. Farnfield og medarbeidrarar (2012) studerte både yngre og eldre menn før og etter 12 veker med styrketrening og proteininntak eller placebo. Dei yngre viste ingen endring av p-p70S6k to timer etter den første treningsøkta, medan dei eldre hadde signifikant auke i aktiveringa av p70S6k (Farnfield et al., 2012). Etter treningsintervensjonen hadde verken dei yngre eller dei eldre noko effekt av styrketreningsøkta og proteinsupplementet (eller placebo) på p-p70S6k. Dette samsvarar ikke med resultata i vår studie kor me finn signifikant auke frå baselinemåling for begge supplementsgruppene og både før og etter intervensionen. Farnfield og

---

<sup>5</sup> Statistiske uteliggjarar er definert som verdiar som ligg tre eller fleire standardavvik frå gjennomsnittet

medarbeidarar (2012) fann heller ingen endring i fosforylering av 4E-BP1 to timer etter treningsøkt ved inntak av verken myseisolat eller placebo, sjølv om det var nesten 100% større aktivering i myse-gruppa. Det same mønsteret vart observert etter 12 veker med styrketrening og myse- eller placebosupplementering (Farnfield et al., 2012). I studien vår fann me, som nemnt tidlegare, ingen auke i p-4E-BP1 etter første akuttøkt, medan etter andre akuttøkt var p-4E-BP1 auka i både mjølkegruppa og nativ myse-gruppa. Dette indikera at det har førekome ei endring i signaleringa frå før til etter intervensjonen i motsetnad til kva Farnfield og medarbeidarar (2012) fann.

I nativ myse-gruppa var p70S6k signifikant mindre fosforylert etter samanlikna med før intervensjonen. Det kan vera eit resultat av endra signaleringsmønsteret som fylgje av 12 veker med trening og proteininntak. Det kan tenkast at den intracellulære signaleringa har vore meir effektiv, altså vil ein etter 2 timer ha kome lenger ned i signalkaskaden etter intervensjonen samanlikna med før. I ein review frå 2015 kor resultat frå fleire studiar vart inkludert, fann Damas og medarbeidarar at trena individ har ein raskare, men meir kortvarig auke i MPS etter ei treningsøkt enn utrente har (Damas et al., 2015). Det vart ikkje inkludert signaleringsdata i reviewartikkelen, men det bør vera ein viss samanheng mellom tidsforløpa til signalering og MPS. I vår studie fann me òg at fosforylert p70S6k i nativ myse-gruppa var signifikant redusert etter intervensjon samanlikna med før intervensjon medan mjølkegruppa ikkje viste same respons. Dersom ein kombinerer teorien om auka hastigkeit i signalvegane, altså at signala forflyttar seg raskare, og hurtig fordøyning av myse samanlikna med kasein, kan det vera mogleg at maksimal fosforylering av p70S6k allereie er forbi ved to timer etter trening og proteininntak i trena tilstand, i motsetnad til mjølkegruppa. I tillegg viste 4E-BP1 signifikant auka fosforylering to timer etter økt i trena tilstand, som styrkar hypotesen om hurtigare signalering intramuskulært.

Treningsøkta Farnfield og medarbeidarar (2012) nytta i si studie var 3 x 8 repetisjonar maksimal unilateral kneeekstensjon. Sjølv om treninga er tung, er volumet forholdsvis lågt, samanlikna med vår økt, kor forsøkspersonane gjennomførte 3 x 10RM i både kneeekstensjon, beinpress og hammersquat, i tillegg til fire øvingar for overekstremitet. Ein moglegheit er at styrketreningsøkta nytta i studien til Farnfield og medarbeidarar (2012) hadde for lite stimuli, i alle fall for trena individ, til å indusera

ein robust auke i aktiviteten i anabole signalvegar etter gjennomført intervasjon, og derfor får dei ikkje tilsvarende resultat som oss.

## **5.2 Ratio mellom signalprotein og total protein**

Total mengde av p70S6k, eEF2 og 4E-BP1 sett i forhold til total mengde protein endra seg ikkje signifikant frå før til etter intervasjon for nokon av proteina og gruppene, altså var ratioen mellom signalproteina og total mengde protein uendra. Dette tyder på at endringane målt i fosforylering av dei same proteina kan skuldast auka aktivitet i signalvegane. Til tross for ingen endring i ratio, kan mengd signalprotein og mengd total protein ha endra seg like mykje. Dersom det har vore ein auke i både signalprotein og total protein, som ikkje er usannsynleg etter 12 veker med trening, har truleg òg total mengde fosforyerte signalprotein auka dersom det ikkje har førekome ei endring i prosent aktivering.

## **5.3 Effekt på muskelvekst**

Tjukn, tverrsnitt og volum av m. vastus lateralis auka signifikant frå før til etter intervasjonen for både myse- og mjølkegruppa. Det var ingen signifikante forskjellar mellom gruppene.

Det er vist at styrketrening over ein periode på berre 4 veker aukar både tjukn og tverrsnitt av m. vastus lateralis og at proteinsupplement ikkje gir ein vidare auke (Boone et al., 2015). Sidan det var inkludert ei placebo-gruppe i studien til Boone og medarbeidarar, kan ein med relativt stor sikkerheit seia at det var, i dette tilfellet, styrketreninga i seg sjølv som induserte hypertrofi. Det kan tenkjast at etter dei første vekene med stimuli til muskelvekst, er det behov for eit større stimuli og/eller anna stimuli for å indusera ytterlegare hypertrofi. Dersom ein hadde samanlikna proteinsupplement og placebo over til dømes 12 veker, ville ein kanskje kunne observert forskjellar i tverrsnitt, volum og/eller tjukn, så framdagleg proteininntak ikkje var tilstrekkeleg, jf. Cermak et al. (2012). Hulmi og medarbeidarar (2009) undersøkte forskjellige mål på hypertrofi før, under og etter 21 veker med regelbunden

styrketrening og protein- eller placeboinntak. Proteingruppa auka tjukn av m. vastus lateralis etter 10,5 og 21 veker, medan placebogrupperna auka tjukn etter 21 veker (Hulmi, Kovanen, et al., 2009a). For tverrsnitt, auka både protein- og placebogrupperna etter 21 veker, men proteingruppa hadde signifikant større auke i tverrsnitt av m. vastus lateralis samanlikna med placebo (Hulmi, Kovanen, et al., 2009a). Som nemnt tidlegare, viste nativ myse-gruppen signifikant større auke i leucinkonsentrasjon i blod og større grad av fosforylering samanlikna med mjølkegruppen. Dette skulle kunne resultert i ein større auke i MPS og dermed kanskje også større muskelvekst. Det var derimot ingen forskjellar i muskelvekst mellom dei to supplementsgruppene som truleg skuldast at ekstra proteinintiskot ikkje vil ha noko additiv effekt på muskelvekst så framtidleg proteininntak er adekvat (Atherton & Smith, 2012; Schoenfeld et al., 2013).

#### **5.4 Muskelstyrke (1RM)**

Begge supplementeringsgruppene auka 1RM i benkpress og beinpress frå før til etter intervensjon utan forskjell mellom gruppene. Dette samsvarar godt med resultata frå andre studiar (Hartman et al., 2007; Volek et al., 2013; Wilborn et al., 2013) kor høvesvis soya, karbohydrat & myse, myse & kasein, og myse & soya vart samanlikna. Det er få intervensjonsstudiar som har samanlikna ulike mjølkeprotein og det har ikkje blitt observert forskjellar i 1RM mellom dei ulike proteinsupplementa. I studien til Hartman og medarbeidarar (2007) fann dei ein tendens mot forskjell mellom myse og soya i 1RM i kneekstensjon ( $p = 0,077$ ). Det har likevel blitt funne forskjellar i endring i muskelmasse mellom myse- og soyaprotein, i favør myseprotein (Volek et al., 2013), men desse forskjellane vart ikkje reflektert i den aukande muskelstyrken. Våre forsøkspersonar auka 1RM i benkpress og beinpress med høvesvis  $27 \pm 9$  og  $33 \pm 15\%$ , som er rundt det Kraemer og medarbeidarar føreslår som forventa framgang dei første 12 vekene med regelmessig, tung styrketrening (Kraemer et al., 2002). Til samanlikning fann Hulmi og medarbeidarar ein auke i 1RM i beinpress på  $\sim 19\%$  etter 21 veker med styrketrening to gongar per vike. Dette viser at styrketreningsprogrammet nytta i vår studie var svært effektivt for å auka muskelstyrke og at proteinsupplementa ikkje påverka denne effekten forskjellig.

## **5.5 Kan anabol signalering predikera MPS og hypertrofi?**

Studiar som har funne auka anabol signalering har òg funne auka MPS, men nokre studiar finn auka MPS til tross for manglande auke i aktivering av sentrale signalprotein. I vår studie var det var forskjellig grad av fosforylering frå signalprotein til signalprotein og til dels mellom gruppene, men det var ingen forskjell i auken i muskelstyrke og -masse.

Mitchell og medarbeidarar (2014) fann auka MPS 1-3 og 3-6 timer etter éi styrketreningsøkt med påfylgjande næringsinntak I samband med dette fann dei òg signifikant auka p-mTOR 1 og 3 timer etter økta (C. J. Mitchell et al., 2014). Liknande resultat vart observert i studien til West og medarbeidarar (2012) kor MPS auka 1-3 og 3-5 timer etter treningsøkt og proteininntak, i tillegg fann dei auka fosforylering av mTOR og p70S6k 1, 3 og 5 timer etter økta (West et al., 2012). Desse funna fører til ei antaking om at anabole signalprotein, som mTOR og p70S6k, i stor grad kan predikera responsen i MPS etter styrketrening og proteininntak.

Det er dermed ikkje slik at MPS aukar i takt med fosforylering av til dømes mTOR og p70S6k. I 2011 vart det gjort ei studie kor forsøkspersonane fekk 25g myseprotein anten i éin dose eller ti mindre dosar (West et al., 2011). Dette førte til at gruppa som fekk ein bolus med protein, heretter omtalt som ”bolus”, auka MPS 1-3 og 3-5 timer etter styrketreningsøkta, medan gruppa som fekk proteininntaket spreidd i fleire dosar, heretter omtalt som ”spreidd”, viste berre signifikant auke i MPS 3-5 timer etter økta. I tillegg hadde bolus signifikant større auke i MPS samanlikna med spreidd-gruppa. Det var ingen forskjell i p-mTOR mellom gruppene, medan bolus viste signifikant større aktivering av p70S6k samanlikna med spreidd-gruppa éin time etter økt. Det ser derfor ut til at p-p70S6k er den foreløpig beste indikatoren på MPS-respons.

Dersom p-p70S6k hadde vore ein god indikator for respons i MPS, kunne aukande dosar med protein som fører til aukande respons i MPS, òg moglegvis resultert i aukande fosforylering av p70S6k. Moore og medarbeidarar (2009) undersøkte nettopp dette og dei fann aukande MPS ved inntak av 0g, 5-10g og 20-40g protein, men det var ingen forskjell i p-p70S6k mellom dei forskjellige proteindosane (Moore, Robinson, et al., 2009a). Det var heller ingenting som tyda på at større dosar protein gav lengre

aktivering av p-p70S6k. Ved ulike dosar protein og same styrketreningsøkt, ser ikkje p-p70S6k ut til å vera ein god indikator for MPS-respons.

Ved styrketrening og proteininntak samanlikna med styrketrening utan proteininntak, kan biletet sjå annleis ut. Dreyer og medarbeidrarar (2008) undersøkte dette og fann at to timer etter treningsøkta, hadde gruppa som inntok protein signifikant større respons i MPS og p-p70S6k samanlikna med gruppa som berre utførte styrketreninga (Dreyer et al., 2008). Det er òg vist at p-p70S6k 1 time etter éi styrketreningsøkt korrelera med MPS 1-2 timer etter økta hjå yngre personar (Kumar et al., 2009b). Det er fleire studiar som har målt både fosforylering av p70S6k og MPS, men som ikkje rapporterer om noko korrelasjon mellom dei to (Camera et al., 2015; Churchward-Venne et al., 2014; C. J. Mitchell et al., 2015a; W. K. Mitchell et al., 2015b). Truleg har fleire undersøkt nettopp dette, men i mangel på signifikante korrelasjoner, vert resultata utelatt frå artiklane. Det er nok ei stor grad av underrapportering av ikkje-signifikante resultat her.

Kva med samanhengen mellom anabol signalering og hypertrofi? Det har blitt funne sterk korrelasjon mellom p-p70S6k 30 minutt etter ei styrketreningsøkt og prosentvis endring i feittfri masse, 1RM i knebøy, tverrsnitt av type II-fiber og feittfri masse i bein som fylgje av 14 veker med regelbunden styrketrening (Terzis et al., 2008). Utfordringa med denne studien er at dei hadde få deltakarar i studien ( $n=6$ ) og det vert derfor satt spørjeteikn ved om dette er reelle funn eller ein tilfeldigheit.

p-p70S6k vart forsøkt korrelert med endringar i blant anna muskelmasse, tverrsnitt, tjukn og volum av m. vastus lateralis, utan at me fann signifikante korrelasjoner mellom p70S6k og nokon av desse måla, i motsetnad til Baar og Esser (1999) som fann signifikant korrelasjon mellom fosforylert p70S6k seks timer etter trening og endring i muskelmasse etter seks veker med regelbunden trening hjå rotter (Baar & Esser, 1999). Våre resultat i fosforylering er frå to timer etter treningsøkt, i motsetnad til resultata til Baar og Esser, som igjen vil gi eit litt anna biletet enn det me ville studera.

Me fann i vår studie at p-4E-BP1 var signifikant negativt korrelert med endring i muskelmasse over ein 12-vekers trenings- og suppleringsintervensjon. Auken i muskelmassen i bein både prosentvis og absolutt var signifikant negativt korrelert med fosforylering av 4E-BP1 etter første akuttøkt. Òg prosent auke i tjukn av m. vastus

lateralis var signifikant negativt korrelert med p-4E-BP1 etter første akuttøkt. Desse korrelasjonane stemmer ikkje heilt med det som ein skulle kunne forventa. Redusert fosforylering av 4E-BP1 fører til inhibering av translasjonsinitieringa og dermed redusert proteinsyntese (Dodd & Tee, 2012) og heng derfor ikkje saman med auka muskelmasse og tjukn. Mitchell et al., 2014 har òg korrelert 4E-BP1 målt 1 time etter treningsøkt og prosentvis endring i muskelvolum etter 16 veker med styrketrening og funne signifikant positiv korrelasjon ( $r = 0,42$ ) (C. J. Mitchell et al., 2014).

Korrelasjonane er i beste fall moderate i begge tilfelle og truleg av liten praktisk tyding.

Til tross for målte forskjellar i vår studie i p-p70S6k og [leucin] i blod, var det ingen forskjellar i styrke-, tjukn-, tverrsnitt- og volumendring mellom supplementsgruppene. Det er heller ikkje sikkert at det hadde blitt målt forskjell i MPS mellom dei to gruppene. Det har nemleg blitt vist i dyrestudiar at MPS-responsen etter inntak av leucin kan vera tilnærma maksimal ved berre låg grad av aktivering av p70S6k (Crozier et al., 2005). Ved maksimal stimulering av MPS gjenteke gonger vil ein òg kunne forventa muskulære adaptasjoner etter ein treningsperiode, så til tross for forskjellar i p70S6k-aktivering og leucinkonsentrasjon i blod, ser det ikkje ut til at det har nokon praktisk tyding for sluttresultatet: muskelvekst og styrkeauke.

Ettersom me ikkje har målt MPS i vår studie, er det ikkje mogleg å konkludera med auka MPS som fylgle av at me målte auka p-p70S6k, men ut ifrå studiane referert til ovanfor tyder det på at forsøkspersonane har hatt ein auke i MPS etter treningsøktene både før og etter intervensjonen. I tillegg oppnådde forsøkspersonane våre hypertrofi og auka muskelstyrke etter intervensjonen som må ha vore eit resultat av positiv nettobalanse etter styrketrening og proteininntak. Me fann likevel ingen signifikant korrelasjon mellom p-p70S6k og forskjellige mål på muskelvekst eller -styrke. For å indusera hypertrofi, må nettobalanse vera positiv regelmessig. Anabole signalprotein kan vera gode markørar for MPS på gruppenivå, men det er ikkje alltid eit fast mønster i signaleringa og MPS-respons dersom ein studera enkeltindivid. I tillegg er det ikkje sikkert at signaleringa er lik frå gong til gong (som observert for våre forsøkspersonar), det vil truleg vera avhengig av både treninga som vert utført og energistatus, som reflektert i manglende korrelasjon mellom fosforylering av p70S6k før og etter treningsintervensjonen. Likevel er det slik at dei aller fleste utrente som utfører

styrketrening regelmessig og har eit adekvat proteininntak, får muskelvekst og auka muskelstyrke.

## **6. Konklusjon**

Hovudhensikta med denne masteroppgåva var å undersøka aktivering av signalproteina p70S6k, 4E-BP1 og eEF2 hjå yngre forsøkspersonar før og etter ein styrke- og supplementeringsintervensjon. Supplementa var anten nativ myse eller lettmjølk.

Hypotese nr. 1 var at det ville vera auka aktivitet i anabole signalvegar etter éi styrketreningsøkt ved inntak av nativ myse samanlikna med lettmjølk, fordi [leucin] i blod er høgare etter inntak av nativ myse. Me fann at p-p70S6k auka signifikant frå baseline etter første akuttøkt for nativ myse-gruppa og at nativ myse-gruppa auka signifikant meir enn mjølkegruppa. For både p-eEF2 og p-4E-BP1 var det ingen endring etter første akuttøkt for nokon av gruppene. Hypotese nr. 1 var derfor bekrefta.

Hypotese nr. 2 var at det ville vera lågare aktivitet i anabole signalvegar etter éi styrketreningsøkt som fylgle av 12 vekers treningsperiode samanlikna med før treningsperioden. P-p70S6k var signifikant auka frå før til etter akuttøkt hjå begge grupper, men nativ myse-gruppa viste signifikant lågare grad av fosforylering etter intervension samanlikna med før intervension. p-4E-BP1 auka signifikant frå før til etter andre akuttøkt i begge grupper, men det var berre mjølkegruppa som hadde signifikant auke frå før til etter intervension. For eEF2 var det framleis ingen endring i fosforyleringsstatus. Hypotese nr.2 kan derfor ikkje bekreftast sjølv om nativ myse-gruppa hadde lågare aktivering av p70S6k etter treningsperioden og me trur at det er først og fremst endring i tidsforløpet til dei ulike signalproteina som er endra gjennom treningsperioden.

Hypotese nr. 3 var at det ville vera større endringar i muskelmasse og -styrke hjå nativ myse-gruppa samanlikna med lettmjølk-gruppa etter 12 veker med regelbunden styrketrening og protein-supplementering. Hypotese nr. 3 kan ikkje bekreftast grunna manglende forskjellar mellom gruppene i auka muskelmasse og -styrke.

Me fann større auke i [leucin] i blod og aktivering av p70S6k etter første styrketreningsøkt hjå nativ myse-gruppa samanlikna med mjølkegruppa, men det ført ikkje til større muskelvekst og -styrke. Dette tyder på at desse enkeltfaktorane som sannsynlegvis har betyding for MPS akutt, ikkje er av stor viktigkeit for dei overordna måla: hypertrofi og auka muskelstyrke, og at akutte forskjellar truleg vert utlikna over tid med robuste stimuli i form av adekvat proteininntak og hensiktsmessig styrketrening.

## Kjelder

- Aas, S. (2014). *Effekten av ulike melkeproteinprodukter på hypertrofisignalering etter en styrketreningsøkt*. Masteroppgåve ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne, NIH, Oslo.
- Adams, G. R., & Bamman, M. M. (2012). Characterization and regulation of mechanical loading-induced compensatory muscle hypertrophy. *Compr Physiol*, 2(4), 2829–2870. <http://doi.org/10.1002/cphy.c110066>
- Anthony, J. C., Yoshizawa, F., Anthony, T. G., Vary, T. C., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2000). Leucine Stimulates Translation Initiation in Skeletal Muscle of Postabsorptive Rats via a Rapamycin-Sensitive Pathway. *The Journal of Nutrition*, 130(10), 7.
- Apró, W. (2014). Regulation of protein synthesis in human skeletal muscle : separate and combined effects of exercise and amino acids. *Acta Physiologica* (Vol. 200, pp. 237–248). Inst för klinisk vetenskap, intervention och teknik / Dept of Clinical Science, Intervention and Technology.
- Areata, J. L., Burke, L. M., Ross, M. L., Camera, D. M., West, D. W., Broad, E. M., et al. (2013). Timing and distribution of protein ingestion during prolonged recovery from resistance exercise alters myofibrillar protein synthesis. *J Physiol*, 591(Pt 9), 2319–2331. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.244897>
- Atherton, P. J., & Smith, K. (2012). Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. *J Physiol*, 590(Pt 5), 1049–1057. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225003>
- Atherton, P. J., Etheridge, T., Watt, P. W., Wilkinson, D., Selby, A., Rankin, D., et al. (2010a). Muscle full effect after oral protein: time-dependent concordance and discordance between human muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Am J Clin Nutr*, 92(5), 1080–1088. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29819>
- Atherton, P. J., Kumar, V., Selby, A. L., Rankin, D., Hildebrandt, W., Phillips, B. E., et al. (2016). Enriching a protein drink with leucine augments muscle protein synthesis after resistance exercise in young and older men. *Clin Nutr*, 0(0). <http://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.04.025>
- Atherton, P. J., Smith, K., Etheridge, T., Rankin, D., & Rennie, M. J. (2010b). Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino Acids*, 38(5), 1533–1539. <http://doi.org/10.1007/s00726-009-0377-x>
- Baar, K., & Esser, K. (1999). Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 1), C120–7.
- Biolo, G., Maggi, S. P., Williams, B. D., Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (1995). Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance

- exercise in humans. *American Journal of Physiology*, 268(514), 7.
- Biolo, G., Tipton, K. D., Klein, S., & Wolfe, R. R. (1997). An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *American Journal of Physiology*, 273(122), 8.
- Boone, C. H., Stout, J. R., Beyer, K. S., Fukuda, D. H., & Hoffman, J. R. (2015). Muscle strength and hypertrophy occur independently of protein supplementation during short-term resistance training in untrained men. *Appl Physiol Nutr Metab*, 40(8), 797–802. <http://doi.org/10.1139/apnm-2015-0027>
- Borsheim, E., Cree, M. G., Tipton, K. D., Elliott, T. A., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2004). Effect of carbohydrate intake on net muscle protein synthesis during recovery from resistance exercise. *J Appl Physiol* (1985), 96(2), 674–678. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.00333.2003>
- Burd, N. A., Tang, J. E., Moore, D. R., & Phillips, S. M. (2009). Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J Appl Physiol* (1985), 106(5), 1692–1701. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.91351.2008>
- Burd, N. A., West, D. W. D., Moore, D. R., Atherton, P. J., Staples, A. W., Prior, T., et al. (2011). Enhanced amino acid sensitivity of myofibrillar protein synthesis persists for up to 24 h after resistance exercise in young men. *J Nutr*, 141(4), 568–573. <http://doi.org/10.3945/jn.110.135038>
- Burke, L. M., Hawley, J. A., Ross, M. L., Moore, D. R., Phillips, S. M., Slater, G. R., et al. (2012). Preexercise aminoacidemia and muscle protein synthesis after resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 44(10), 1968–1977. <http://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31825d28fa>
- Byfield, M. P., Murray, J. T., & Backer, J. M. (2005). hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 33076–33082. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507201200>
- Camera, D. M., West, D. W. D., Phillips, S. M., Rerecich, T., Stellingwerff, T., Hawley, J. A., & Coffey, V. G. (2015). Protein ingestion increases myofibrillar protein synthesis after concurrent exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 47(1), 82–91. <http://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000390>
- Cermak, N. M., Res, P. T., de Groot, L. C., Saris, W. H., & van Loon, L. J. (2012). Protein supplementation augments the adaptive response of skeletal muscle to resistance-type exercise training: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 96(6), 1454–1464. <http://doi.org/10.3945/ajcn.112.037556>
- Churchward-Venne, T. A., Breen, L., Di Donato, D. M., Hector, A. J., Mitchell, C. J., Moore, D. R., et al. (2014). Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double-blind, randomized trial. *Am J Clin Nutr*, 99(2), 276–286. <http://doi.org/10.3945/ajcn.113.068775>

- Churchward-Venne, T. A., Burd, N. A., & Phillips, S. M. (2012a). Nutritional regulation of muscle protein synthesis with resistance exercise: strategies to enhance anabolism. *Nutrition & Metabolism*, 9(40), 8.
- Churchward-Venne, T. A., Burd, N. A., Mitchell, C. J., West, D. W., Philp, A., Marcotte, G. R., et al. (2012b). Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. *J Physiol*, 590(Pt 11), 2751–2765.  
<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.228833>
- Crozier, S. J., Kimball, S. R., Emmert, S. W., Anthony, J. C., & Jefferson, L. S. (2005). Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr*, 135(3), 376–382.
- Cuthbertson, D., Smith, K., Babraj, J., Leese, G., Waddell, T., Atherton, P., et al. (2005). Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *The FASEB Journal*, 19(422), 22.
- D'Souza, R. F., Marwirth, J. F., Figueiredo, V. C., Gatta, Della, P. A., Petersen, A. C., Mitchell, C. J., & Cameron-Smith, D. (2014). Dose-dependent increases in p70S6K phosphorylation and intramuscular branched-chain amino acids in older men following resistance exercise and protein intake. *Physiol Rep*, 2(8), e12112–e12112.  
<http://doi.org/10.14814/phy2.12112>
- Damas, F., Phillips, S., Vechin, F. C., & Ugrinowitsch, C. (2015). A review of resistance training-induced changes in skeletal muscle protein synthesis and their contribution to hypertrophy. *Sports Med*, 45(6), 801–807.  
<http://doi.org/10.1007/s40279-015-0320-0>
- De Feo, P., Horber, F. F., & Haymond, M. W. (1992). Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. *Am J Physiol*, 263(4 Pt 1), E794–9.
- Devries, M. C., & Phillips, S. M. (2015). Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. *J Food Sci*, 80 Suppl 1, A8–A15.  
<http://doi.org/10.1111/1750-3841.12802>
- Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Walker, D. K., Reidy, P. T., Borack, M. S., Drummond, M. J., et al. (2014). Leucine-enriched amino acid ingestion after resistance exercise prolongs myofibrillar protein synthesis and amino acid transporter expression in older men. *J Nutr*, 144(11), 1694–1702.  
<http://doi.org/10.3945/jn.114.198671>
- Dideriksen, K., Reitelseder, S., & Holm, L. (2013). Influence of amino acids, dietary protein, and physical activity on muscle mass development in humans. *Nutrients*, 5(3), 852–876. <http://doi.org/10.3390/nu5030852>
- Dodd, K. M., & Tee, A. R. (2012). Leucine and mTORC1: a complex relationship. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(11), E1329–42.

<http://doi.org/10.1152/ajpendo.00525.2011>

Dreyer, H. C., Drummond, M. J., Pennings, B., Fujita, S., Glynn, E. L., Chinkes, D. L., et al. (2008). Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294(2), E392–400.  
<http://doi.org/10.1152/ajpendo.00582.2007>

Dreyer, H. C., Fujita, S., Cadenas, J. G., Chinkes, D. L., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2006). Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol*, 576(Pt 2), 613–624. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.113175>

Dreyer, H. C., Fujita, S., Glynn, E. L., Drummond, M. J., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2010). Resistance exercise increases leg muscle protein synthesis and mTOR signalling independent of sex. *Acta Physiol (Oxf)*, 199(1), 71–81.  
<http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02074.x>

Drummond, M. J., Dreyer, H. C., Fry, C. S., Glynn, E. L., & Rasmussen, B. B. (2009). Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J Appl Physiol (1985)*, 106(4), 1374–1384.  
<http://doi.org/10.1152/japplphysiol.91397.2008>

Drummond, M. J., Dreyer, H. C., Pennings, B., Fry, C. S., Dhanani, S., Dillon, E. L., et al. (2008). Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol (1985)*, 104(5), 1452–1461. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.00021.2008>

Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J., & Guan, K.-L. (2011). The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*, 7(6), 643–644. <http://doi.org/10.4161/auto.7.6.15123>

Farnfield, M. M., Breen, L., Carey, K. A., Garnham, A., & Cameron-Smith, D. (2012). Activation of mTOR signalling in young and old human skeletal muscle in response to combined resistance exercise and whey protein ingestion. *Appl Physiol Nutr Metab*, 37(1), 21–30. <http://doi.org/10.1139/h11-132>

Fujita, S., Dreyer, H. C., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Cadenas, J. G., Yoshizawa, F., et al. (2007). Nutrient signalling in the regulation of human muscle protein synthesis. *J Physiol*, 582(Pt 2), 813–823.  
<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.134593>

Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., et al. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & Development*, 13(11), 1422–1437.

Goodman, C. A., Mayhew, D. L., & Hornberger, T. A. (2011). Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cell Signal*, 23(12), 1896–1906. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.07.013>

- Greenhaff, P. L., Karagounis, L. G., Peirce, N., Simpson, E. J., Hazell, M., Layfield, R., et al. (2008). Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(3), E595–604. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.90411.2008>
- Hartman, J. W., Tang, J. E., Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Lawrence, R. L., Fullerton, A. V., & Phillips, S. M. (2007). Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters. *Am J Clin Nutr*, 86(2), 373–381.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 18(16), 1926–1945.
- Hornberger, T. A. (2011). Mechanotransduction and the regulation of mTORC1 signaling in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(9), 1267–1276. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.05.007>
- Hulmi, J. J., Kovanen, V., Selänne, H., Kraemer, W. J., Häkkinen, K., & Mero, A. A. (2009a). Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression. *Amino Acids*, 37(2), 297–308. <http://doi.org/10.1007/s00726-008-0150-6>
- Hulmi, J. J., Laakso, M., Mero, A. A., Häkkinen, K., Ahtiainen, J. P., & Peltonen, H. (2015). The effects of whey protein with or without carbohydrates on resistance training adaptations. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(1), 48. <http://doi.org/10.1186/s12970-015-0109-4>
- Hulmi, J. J., Tannerstedt, J., Selänne, H., Kainulainen, H., Kovanen, V., & Mero, A. A. (2009b). Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol (1985)*, 106(5), 1720–1729. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.00087.2009>
- Kraemer, W. J., Adams, K., Cafarelli, E., Dudley, G. A., Dooly, C., Feigenbaum, M. S., et al. (2002, February). American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise*.
- Kumar, V., Atherton, P., Smith, K., & Rennie, M. J. (2009a). Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *J Appl Physiol (1985)*, 106(6), 2026–2039. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.91481.2008>
- Kumar, V., Selby, A., Rankin, D., Patel, R., Atherton, P., Hildebrandt, W., et al. (2009b). Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol*, 587(1), 211–217. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.164483>
- Lahne, J. A. L. (2013). *Nativt myseprotein gir større og raskere økning av aminosyrer i blod enn behandlede mysefraksjoner og lettmelk, men ikke raskere restitusjon av muskelfunksjon*. Masteroppgåve ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne, NIH, Oslo.

- Mayhew, D. L., Kim, J.-S., Cross, J. M., Ferrando, A. A., & Bamman, M. M. (2009). Translational signaling responses preceding resistance training-mediated myofiber hypertrophy in young and old humans., *107*(5), 1655–1662. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.91234.2008>
- Mitchell, C. J., Churchward-Venne, T. A., Parise, G., Bellamy, L., Baker, S. K., Smith, K., et al. (2014). Acute post-exercise myofibrillar protein synthesis is not correlated with resistance training-induced muscle hypertrophy in young men. *PLoS One*, *9*(2), e89431. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089431>
- Mitchell, C. J., McGregor, R. A., D'Souza, R. F., Thorstensen, E. B., Markworth, J. F., Fanning, A. C., et al. (2015a). Consumption of Milk Protein or Whey Protein Results in a Similar Increase in Muscle Protein Synthesis in Middle Aged Men. *Nutrients*, *7*(10), 8685–8699. <http://doi.org/10.3390/nu7105420>
- Mitchell, W. K., Phillips, B. E., Williams, J. P., Rankin, D., Lund, J. N., Smith, K., & Atherton, P. J. (2015b). A dose- rather than delivery profile-dependent mechanism regulates the “muscle-full” effect in response to oral essential amino acid intake in young men. *J Nutr*, *145*(2), 207–214. <http://doi.org/10.3945/jn.114.199604>
- Moore, D. R., Atherton, P. J., Rennie, M. J., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2011). Resistance exercise enhances mTOR and MAPK signalling in human muscle over that seen at rest after bolus protein ingestion. *Acta Physiol (Oxf)*, *201*(3), 365–372. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02187.x>
- Moore, D. R., Churchward-Venne, T. A., Witard, O., Breen, L., Burd, N. A., Tipton, K. D., & Phillips, S. M. (2015). Protein ingestion to stimulate myofibrillar protein synthesis requires greater relative protein intakes in healthy older versus younger men. *The Journals of Gerontology. Series a, Biological Sciences and Medical Sciences*, *70*(1), 57–62. <http://doi.org/10.1093/gerona/glu103>
- Moore, D. R., Robinson, M. J., Fry, J. L., Tang, J. E., Glover, E. I., Wilkinson, S. B., et al. (2009a). Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr*, *89*(1), 161–168. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26401>
- Moore, D. R., Tang, J. E., Burd, N. A., Rerecich, T., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009b). Differential stimulation of myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis with protein ingestion at rest and after resistance exercise. *J Physiol*, *587*(Pt 4), 897–904. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.164087>
- Morton, R. W., McGlory, C., & Phillips, S. M. (2015). Nutritional interventions to augment resistance training-induced skeletal muscle hypertrophy. *Frontiers in Physiology*, *6*, 245. <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00245>
- Nagasawa, T., Kido, T., Yoshizawa, F., Ito, Y., & Nishizawa, N. (2002). Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(2), 121–127.

- Nakashima, K., Ishida, A., Yamazaki, M., & Abe, H. (2005). Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(2), 660–666. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.138>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2015). Bioactive properties of milk proteins in humans: A review. *Peptides*, 73, 20–34. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.08.009>
- Perez-Schindler, J., Hamilton, D. L., Moore, D. R., Baar, K., & Philp, A. (2015). Nutritional strategies to support concurrent training. *European Journal of Sport Science*, 15(1), 41–52. <http://doi.org/10.1080/17461391.2014.950345>
- Phillips, S. M. (2014). A brief review of critical processes in exercise-induced muscular hypertrophy. *Sports Med*, 44 Suppl 1, S71–7. <http://doi.org/10.1007/s40279-014-0152-3>
- Phillips, S. M., Tipton, K. D., Aarsland, A., Wolf, S. E., & Wolfe, R. R. (1997). Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 1), E99–107.
- Philp, A., Hamilton, D. L., & Baar, K. (2011). Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1, 110(2), 561–568. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.00941.2010>
- Pullen, N., & Thomas, G. (1997). The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Letters*, 410(1), 78–82.
- Raastad, T. (2011). Protein. I: Garthe, I. & Helle, C. (red). *Idrettsernæring* (s. 59-72). Oslo: Gyldendal Norsk Forlag.
- Raastad, T. & Paulsen, G. (2010). Hva er stimuli for muskelvekst ved styrketrenings? I: Raastad, T., Paulsen, G., Refsnes, P. E., Rønnestad, B. R. & Wisnes, A. R., *Styrketrenings – i teori og praksis* (s. 83 – 106). Oslo: Gyldendal Undervisning.
- Rahbek, S. K., Farup, J., de Paoli, F., & Vissing, K. (2015). No differential effects of divergent isocaloric supplements on signaling for muscle protein turnover during recovery from muscle-damaging eccentric exercise. *Amino Acids*, 47(4), 767–778. <http://doi.org/10.1007/s00726-014-1907-8>
- Rahbek, S. K., Farup, J., Møller, A. B., Vendelbo, M. H., Holm, L., Jessen, N., & Vissing, K. (2014). Effects of divergent resistance exercise contraction mode and dietary supplementation type on anabolic signalling, muscle protein synthesis and muscle hypertrophy. *Amino Acids*, 46(10), 2377–2392. <http://doi.org/10.1007/s00726-014-1792-1>
- Reidy, P. T., Walker, D. K., Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., et al. (2013). Protein blend ingestion following resistance exercise promotes human muscle protein synthesis. *J Nutr*, 143(4), 410–416. <http://doi.org/10.3945/jn.112.168021>

- Reitelseder, S., Agergaard, J., Doessing, S., Helmark, I. C., Lund, P., Kristensen, N. B., et al. (2011). Whey and casein labeled with L-[1-13C]leucine and muscle protein synthesis: effect of resistance exercise and protein ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300(1), E231–42. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00513.2010>
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 23(3), 160–170. <http://doi.org/10.1152/physiol.00041.2007>
- Schoenfeld, B., Aragon, A., & Krieger, J. W. (2013). The effect of protein timing on muscle strength and hypertrophy: a meta-analysis. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 10(1), 53. <http://doi.org/10.1186/1550-2783-10-53>
- Skålhegg, B. S. (2012). Protein. I: Drevon, C. A. & Blomhoff, R. (red), *Mat og medisin* (s. 103-115). Kristiansand: Cappelen Damm Høyskoleforlaget.
- Smith, K., Reynolds, N., Downie, S., Patel, A., & Rennie, M. J. (1998). Effects of flooding amino acids on incorporation of labeled amino acids into human muscle protein. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 1), E73–8.
- Tang, J. E., Moore, D. R., Kujbida, G. W., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009). Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* (1985), 107(3), 987–992. <http://doi.org/10.1152/japplphysiol.00076.2009>
- Tang, J. E., Perco, J. G., Moore, D. R., Wilkinson, S. B., & Phillips, S. M. (2008). Resistance training alters the response of fed state mixed muscle protein synthesis in young men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(1), R172–8. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00636.2007>
- Terzis, G., Georgiadis, G., Stratakos, G., Vogiatzis, I., Kavouras, S., Manta, P., et al. (2008). Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol*, 102(2), 145–152. <http://doi.org/10.1007/s00421-007-0564-y>
- Tipton, K. D., Elliott, T. A., Cree, M. G., Aarsland, A. A., Sanford, A. P., & Wolfe, R. R. (2007). Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1), E71–6. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00166.2006>
- Tipton, K. D., Elliott, T. A., Ferrando, A. A., Aarsland, A. A., & Wolfe, R. R. (2009). Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. *Appl Physiol Nutr Metab*, 34(2), 151–161. <http://doi.org/10.1139/H09-006>
- Tipton, K. D., Ferrando, A. A., Phillips, S. M., Doyle, D. J., & Wolfe, R. R. (1999). Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *American Journal of Physiology*.

- Volek, J. S., Volk, B. M., Gomez, A. L., Kunce, L. J., Kupchak, B. R., Freidenreich, D. J., et al. (2013). Whey protein supplementation during resistance training augments lean body mass. *J Am Coll Nutr*, 32(2), 122–135.  
<http://doi.org/10.1080/07315724.2013.793580>
- West, D. W. D., Burd, N. A., Churchward-Venne, T. A., Camera, D. M., Mitchell, C. J., Baker, S. K., et al. (2012). Sex-based comparisons of myofibrillar protein synthesis after resistance exercise in the fed state., 112(11), 1805–1813.  
<http://doi.org/10.1152/japplphysiol.00170.2012>
- West, D. W., Burd, N. A., Coffey, V. G., Baker, S. K., Burke, L. M., Hawley, J. A., et al. (2011). Rapid aminoacidemia enhances myofibrillar protein synthesis and anabolic intramuscular signaling responses after resistance exercise. *Am J Clin Nutr*, 94(3), 795–803. <http://doi.org/10.3945/ajcn.111.013722>
- Widmaier, E. P., Raff, H. & Strang, K. T. (2014). *Vander's Human Physiology: The mechanisms of body function*. New York: McGraw-Hill.
- Wilborn, C. D., Taylor, L. W., Outlaw, J., Williams, L., Campbell, B., Foster, C. A., et al. (2013). The Effects of Pre- and Post-Exercise Whey vs. Casein Protein Consumption on Body Composition and Performance Measures in Collegiate Female Athletes. *Journal of Sports Science & Medicine*, 12(1), 74–79.
- Wilkinson, D. J., Hossain, T., Hill, D. S., Phillips, B. E., Crossland, H., Williams, J., et al. (2013). Effects of leucine and its metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J Physiol*, 591(Pt 11), 2911–2923.  
<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.253203>
- Witard, O. C., Jackman, S. R., Breen, L., Smith, K., Selby, A., & Tipton, K. D. (2014). Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. *Am J Clin Nutr*, 99(1), 86–95. <http://doi.org/10.3945/ajcn.112.055517>
- Witard, O. C., Wardle, S. L., Macnaughton, L. S., Hodgson, A. B., & Tipton, K. D. (2016). Protein Considerations for Optimising Skeletal Muscle Mass in Healthy Young and Older Adults. *Nutrients*, 8(4), 181. <http://doi.org/10.3390/nu8040181>
- Wolfe, R. R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr*, 84(3), 475–482.

## **Tabelloversikt**

Tabell 1: oversikt over utvalde akuttstudiar med styrketrening og påfølgjande proteininntak frå 2008 til 2015. Forklaringar: +: signifikant auke frå basal. -: signifikant nedgong frå basal. =: ingen endring frå basal. *: forskjell mellom grupper. +/- (e): endring utelukkande hjå dei eldre. +/- (y): endring utelukkande hjå dei yngre. (S): supplement-gruppe, (K): kontroll-gruppe og (P): placebo-gruppe. KE: kneeekstensjon, TR: trening og KH: karbohydrat. ....	30
Tabell 2: inklusjons- og eksklusjonskriterier.....	32
Tabell 3: utgangsverdiar for forsøkspersonar oppgitt som gjennomsnitt ( $\pm$ standardavvik). Det var ingen signifikante forskjellar mellom gruppene i nokon av parametrane. ....	33
Tabell 4: Næringsinnhald og fordeling av aminosyre i supplementa.....	34
Tabell 5: oversikt over primær- og sekundærantistoffa som vart nytta i analysane.....	40

## Figuroversikt

Figur 1: forenkla oversikt over intracellulær signalering basert på følgjande studiar: Aas, 2014; Apró, 2014; Dodd & Tee, 2012; Drummond, Dreyer, Fry, Glynn, & Rasmussen, 2009; Hornberger, 2011; Kumar, Atherton, Smith, & Rennie, 2009a; Philp, Hamilton, & Baar, 2011; Sandri, 2008. NB! Auka fosforylering av p70S6k fører til inhibering av eEF2k (som gjer at eEF2k ikkje kan inhibera eEF2), som igjen fører til aktivering og redusert fosforylering av eEF2.....	22
Figur 2: oversikt over forskjellige studiar som har målt fosforylering av p70S6k i tida etter éi styrketreningsøkt og/eller proteininntak.....	25
Figur 3: oversikt over forskjellige studiar som har målt fosforylering av 4E-BP1 i tida etter éi styrketreningsøkt og/eller proteininntak.....	27
Figur 4: oversikt over forskjellige studiar som har målt fosforylering av eEF2 i tida etter éi styrketreningsøkt og/eller proteininntak. Redusert fosforylering av eEF2 er ein indikasjon på auka aktivitet i anabole signalvegar.....	29
Figur 5: Tidslinje for akuttdag.....	35
Figur 6: Gel etter elektroforese.....	39
Figur 7: gel (t.v.) og membran (midt) etter endt blotting. Markørvekt (t.h.) nytta til å identifisera protein etter vekt (kDa).....	39
Figur 8: leucinkonsentrasjon i blod før (t.v.) og etter (t.h.) treningsintervensjonen. Tidspunkt "pre" er før sjølve treningsøkta. "-0,5" er tidspunktet direkte etter treningsøkta og rett før proteininntak. *: signifikant forskjell fra pre innanfor same supplementeringsgruppe, #: signifikant forskjell mellom gruppene på same tidspunkt. 42	
Figur 9: individuelle data for ratio mellom fosforylert p70S6k og total p70S6k. Over er representative Western Blot-band på p70S6k for høvesvis fosforlyert og total protein. *: signifikant forskjell fra baseline til etter akuttøkt ( $p < 0,05$ ), §: signifikant forskjell fra før til etter treningsintervensjon innanfor same supplementsgruppe ( $p < 0,05$ ), #: signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) mellom supplementsgruppene på same tidspunkt.....	43
Figur 10: individuelle data for ratio mellom fosforylert 4E-BP1 og total 4E-BP1. Over er representative Western Blot-band på 4E-BP1 for høvesvis fosforylert og total protein. *: signifikant forskjell fra baseline til etter akuttøkt ( $p < 0,05$ ), #: signifikant forskjell fra før til etter treningsintervensjon innanfor same supplementsgruppe ( $p < 0,05$ ).....	44
Figur 11: individuelle data for ratio mellom fosforylert eEF2 og total eEF2. Øvst er eit representativt eksempel på Western Blot-band for eEF2, både fosforylerte og total protein. To parallelle vart analysert for kvart tidspunkt.....	45
Figur 12: Gjennomsnittleg auke i 1RM for beinpress (t.v.) og benkpress (t.h.). *: signifikant auke samanlikna med pre-intervensjon innanfor same supplementeringsgruppe.....	46

Figur 13: Individuelle data for volum ( $\text{cm}^3$ ), tverrsnitt ( $\text{cm}^2$ ) og tjukn (cm) i m. vastus lateralis. \*: signifikant auke frå utgangsverdi innanfor same supplementeringsgruppe. 47

## Forkortinger

4E-BP1	Eukaryot translasjonsinitieringsfaktor 4E-bindande protein 1
AA	Aminosyrer
Akt/PKB	Protein kinase B
AMPK	AMP aktivert protein kinase
APS	Albuminproteinsyntese
ATP	Adenosintrifosfat
AUC	Area under the curve (areal under kurven)
BCAA/FAA	Forgreina aminosyrer
DXA	Dual X-ray absorptiometry
EAA	Essensielle aminosyrer
eEF2	Eukaryot elongeringsfaktor 2
eEF2k	Eukaryot elongeringsfaktor 2 kinase
elf3	Eukaryot initieringsfaktor 3
elf4E	Eukaryot initieringsfaktor 4E
elf4B	Eukaryot initieringsfaktor 4B
FBR	Fractional Breakdown Rate
FSR	Fractional Synthetic Rate
HM	Hydrolysert myse
hVps34	Human vacuolar protein sorting 34
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LAT1	Large neutral amino acid transporter 1
LBM	Lean body mass
LLM	Lean leg mass
MAP4K3	Mitogen-aktivert protein kinase kinase kinase kinase 3
MK	Mysekonsentrat
MM	Mikropartikulær myse
MPS	Muskelproteinsyntese
MPB	Muskelproteinbryting
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTORC1/2	Mammalian/mechanistic target of rapamycin kompleks 1/2
MVC	Maksimal volontør kontraksjon

NM	Nativ myse
p-p70S6k	Fosforylert p70S6k
p-4E-BP1	Fosforylert 4E-BP1
p-eEF2	Fosforylert eEF2
p70S6k	70 kDa S6 protein kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
Rag GTPase	Ras-relatert guanosin-trifosfat
RCT	Randoimzed controlled study
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RM	Repetisjon maksimum
rpS6	40S ribosomal protein S6
Ser	Serin
SNAT2	Sodium coupled neutral amino acid transporter 2
Thr	Treonin
TSC1/2	Tuberous sclerosis 1/2
ULK1	Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

## Vedlegg

Vedlegg I: Informasjonsskriv og samtykkeskjema



## Forespørsel om deltagelse som forsøksperson

### Hvordan påvirker forskjellige melkeproteinfraksjoner muskelproteinbalanse hos yngre?

Dette skrivet er til alle potensielle forsøkspersoner. Vi ber om din deltagelse i prosjektet, så fremt du oppfyller kriteriene: Du må være i alderen 18-45 år, være normalt aktiv, og ellers være frisk og uten skader i muskelskjelettapparatet. Du kan ikke bruke noen form for medikamenter eller kosttilskudd (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende). Hvis du bruker kosttilskudd kan du likevel delta som forsøksperson ved at du slutter med tilskuddet senest én uke før prosjektstart. Du kan ikke delta om du er laktoseintolerant, har melkeallergi eller er allergisk mot lokalbedøvelse (tilsvarende det man får hos tannlegen).

#### Bakgrunn og hensikt med forsøket

Inntak av proteiner har i seg selv en umiddelbar muskeloppbyggende effekt ved at proteinesyntesen øker; og kombinerer vi proteininntak med styrketreningsfører vi en vesentlig kraftigere effekt. Økningen i proteinesyntesen bestemmes i stor grad av mengden og kvaliteten på proteinet, samt hvor raskt proteinet tas opp i blodet. I tillegg til proteinesyntesen vil også proteinnedbrytningen til enhver tid spille inn på proteinomsetningen i muskulaturen. Sammenliknet med proteinesyntesen vet vi lite om hvordan proteinnedbrytningen påvirkes av proteininntak etter styrketreningen. Ny kunnskap om dette kan gi oss bedre forutsetninger for å maksimere utbyttet av

styrketrening, som vil være av stor interesse for både mosjonister, idrettsutøvere og eldre med tanke på prestasjon i idrett og funksjon i hverdagen.

I denne studien ønsker vi å undersøke om et nyutviklet myseprotein produsert av Tine® kan bedre effekten av styrketrening (føre til større økning i muskelmasse og styrke). Dette nye myseproteinet vil sammenliknes med effekten av vanlig lett melk.

Dette er et dobbelt blindet, randomisert, kontrollert studie, som betyr at verken du eller forskerne du kommer i kontakt med vet hvilken drikk du inntar.

## Gjennomføringen av forsøket

Forsøket går kort fortalt ut på å gjennomføre en teningsperiode på 12 uker med styrketrening tre ganger i uken. Gjennom denne perioden inntas det to enheter på 0,5 l daglig med enten melk eller nativ myse. Du vil bli tilfeldig trukket (randomiseres) til én av gruppene. Før og etter treningsperioden vil det gjennomføres en rekke tester (se under) for å undersøke effekten av de forskjellige drikkene.

### Før treningsperioden

Du skal møte på Norges idrettshøgskole 3 ganger for tilvenning til tester og treningsøvelser, styrketester, måling av kroppssammensetning (DXA) og muskelbiopsier i ukene før forsøket. I tillegg må du møte for en MR-analyse hos Curato røntgen. Tidspunkter for de ulike oppmøtene avtales individuelt. Under følger et eksempel på tidsplan for tester:

Dag 1: Underskrevet samtykke og helseerklæring. Fastende DXA-scan, medbrakt frokost, ultralyd av låret, tilvennig til styrketester (ca. 2-3 timer). Minimum 2 dager hvile. Dag 2: Gjennomføring av styrketester (ca 1 time).

Minimum 2 dager hvile. Dag 3: MR hos Curato røntgen (ca. 40 minutter). Dag 4: Akutforsøk (ca. 5 timer) eller prebiopsi (ca 45 minutter).

Før trenignsstudien må du også gjennomføre en firedagers kostregistrering, en tilsvarende kostregistrering vil gjentas mot slutten av treningsperioden. **I de to**

**siste dagene før tester og biopsi(er) må du avstå fra all krevende fysisk aktivitet (trening).** Fra dagen før biopsiene til dagen etter biopsiene skal du følge en standardisert diett laget av en ernæringsfysiolog.

### **Akuttforsøk**

Tolv deltagere fra hver gruppe trekkes tilfeldig ut til å gjennomføre et akuttforsøk før og etter treningsperioden, dette innebefatter 2 biopsier før treningsperioden og 2 biopsier etter treningsperioden (totalt 4 biopsier). De resterende deltakerne i hver gruppe deltar ikke i akuttstudien og tar bare en biopsi før og en etter treningsperioden. Hensikten med akuttforsøket er å måle hvordan proteinsyntesen og proteininnedbrytingen forandres etter treningsperioden. Oppstart denne dagen vil være mellom kl. 0800 og 1000, og forsøket er ferdig mellom kl. 1330 og 1530. Dagen starter med en biopsi og en styrketest i et kneeekstensionsapparat. Så gjennomføres en styrkeøkt som vil være identisk med en av øktene som gjøres senere i treningsperioden. Etter treningsøkten vil du innta en av de to drikkene, og det vil bli tatt biopsier to timer etter økten. Det vil også bli tatt blodprøver gjennom dagen og gjennomført styrketester rett etter økten, 2 timer etter økten og 24 timer etter økten, for å måle restitusjon. Dermed vil du måtte sette av en hel dag til testdagen (fra 0800- 1000 frem til ca. 1330-1530) og 30 min til styrketesting dagen etter.

### **Treningsperioden**

Treningsperioden starter når man har gjennomført alle testene, og den varer i 12 uker. I disse 12 ukene skal det trenes styrke tre ganger i uken (mandag, onsdag og fredag) med oppfølging av en trener på mandager og fredager økter. Drikkene inntas to ganger om dagen; rett etter trening og på kvelden på treningsdager, og morgen og kveld på treningsfrie dager.

Etter treningsperioden gjennomføres alle testene på nytt for å måle endringer.

### **Tester**

*DXA:* ved et av oppmøtene før testingen gjøres en DXA-analyse for å måle kroppssammensetningen som vil danne grunnlaget for de standardiserte måltidene ved akuttdagen. Denne testen innebefatter at du ligger stille i ca. 10 minutter.

*MR:* for å måle muskelvekst i lår og overarms-muskulaturen benyttes en MR-analyse. Denne testen innebærer at du må ligge i ro ca. 30 minutter. *Ultralyd:* for å måle muskelvekst i m. vastus lateralis (en muskel i låret) gjennomføres en ultralyd av låret.

*1RM tester:* for å måle styrke vil det testes hvor mye du kan løfte maksimalt en gang i styrkeøvelser for overkropp og bein. *Muskelfunksjonstest:* testingen av muskelfunksjonen gjøres i et kneekestensjonsapparat som er låst ved 90° i kneleddet.

*Blodprøver:* blodprøvene vil tas før DXA-scanen og i sammenheng med biopsiene og vil gjøres gjennom venekatetrene slik at det ikke blir noen ekstra stikk for blodprøver. *Biopsier:* For de som tilfeldig velges til å være med på akutforsøket blir det to biopsier før og to biopsier etter treningsperioden. For de som ikke skal være med på akutforsøket blir det en biopsi før og en etter treningsperioden. Biopsiene tas ut på følgende måte:

15. Huden og bindevevet lokalbedøves der vevsprøven skal tas. (
16. Et snitt på ca. 1-2 cm gjøres gjennom hud og muskelfascien. (
17. En nål med diameter på 6 mm føres inn (2-3 cm) og 1-3 små biter av (muskulaturen tas ut (total 2-300 mg). (
18. Snittet lukkes med tape (strips). (**Eventuelle ulemper ved å delta**  
(Deltakelse i prosjektet vil kreve en del tid og oppmerksomhet. Trening skal gjennomføres med stor belastning, og vil medføre en viss risiko for skade og følelse av sårhet/stølhet i muskulaturen. Venekateter medfører en liten infeksjonsfare og det kan oppleves ubehagelig. Vevsprøvetakninger (biopsier) medfører en liten infeksjonsfare, og ubehag/smerter kan oppleves under inngrepet. Du kan også oppleve lette til (

moderate smerter i 1-2 døgn etter inngrepet. Du vil få et lite arr etter snittet i huden; arret vil sakte bli mindre tydelig. Enkelte personer vil kunne få en fortykning av huden i arrområdet.

## **Personvern**

Vi vil kun lagre informasjon om deg under ditt forsøkspersonnummer. Undervis i

forsøket vil vi oppbevare en kodeliste med navn og forsøkspersonnummer. Denne kodelisten vil fysisk være låst inne, slik at det er kun forskerne tilknyttet studien som har adgang til den. Alle som får innsyn i informasjon om deg har taushetsplikt. Innsamlet data vil bli anonymisert etter 15 år (kodelisten destrueres).

Alle prøver vil analyseres "blindet", det vil si at forskerne som utfører den enkelte analysen ikke vet hvilken forsøksperson prøven kommer fra (verken forsøkspersonnummer eller gruppe). Prøver vil bli analysert ved NIH (biopsier), Universitet i Oslo (ernæringsinstituttet; biopsier og blod) og Universitetet i Arkansas, USA (biopsier og blod).

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

### **Biobank**

Biopsiene og blodprøvene vil bli oppbevart i en forskningsbiobank uten kommersielle interesser (vurdert av Regional Etisk Komite). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Prøvene vil bli lagret til år 2028. Ansvarlig for biobanken er Dr. Truls Raastad ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne ved NIH. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjennning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også ditt samtykke til at prøver og identifiserte opplysninger utlevers til ernæringsinstituttet ved universitetet i Oslo og universitetet i Arkansas.

### **Innsynsrett og oppbevaring av materiale**

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

### **Informasjon om utfallet av studien**

Etter at data er innsamlet og analysert vil vi avholde et møte for alle forsøkspersonene der vi presenterer resultatene fra studien.

## **Forsikring**

Deltakere i prosjektet er forsikret dersom det skulle oppstå skade eller komplikasjoner som følge av deltagelse i forskningsprosjektet. NIH er en statlig institusjon og er således selvassurandør. Dette innebærer at det er NIH som dekker en eventuell erstatning og ikke et forsikringsselskap.

## **Finansiering**

Prosjektet er fullfinansiert av Tine® og Norges forskningsråd.

## **Publisering**

Resultatene fra studien vil offentliggjøres i internasjonale, fagfellevurderte, tidsskrift. Du vil få tilsendt artiklene hvis du ønsker det.

## **Samtykke**

Hvis du har lest informasjonsskrivet og ønsker å være med som forsøksperson i prosjektet, ber vi deg undertegne "Samtykke om deltagelse" og returnere dette til en av personene oppgitt nedenfor. Du bekrefter samtidig at du har fått kopi av og lest denne informasjonen.

Det er frivillig å delta og du kan når som helst trekke deg fra prosjektet uten videre begrunnelse. Alle data vil, som nevnt ovenfor, bli avidentifisert før de blir lagt inn i en database, og senere anonymisert.

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med Håvard Hamarsland på tlf: 93 445 916, Gørar Paulsen på tlf: 93429420, eller Truls Raastad på tlf: 23 26 23 28 el. 913 68 896

Vennlig hilsen

Håvard Hamarsland (Stipendiat)

Gørar Paulsen (forsker)

Truls Raastad (Professor)

## **Samtykke til deltakelse i studien**

Jeg er villig til å delta i studien

---

----- (Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

---

----- (Signert, rolle i studien, dato)

Vedlegg II: Styrketreningsprogram, 12 veker

Week	Exercise	Monday			Wednesday			Friday		
		Sets	Reps	Load	Sets	Reps	Load	Sets	Reps	Load
1-3	Squat	2	12	RM	2	10	90% of 12RM	1	8	RM
	Leg press	2	12	RM	2	10	90% of 12RM	2	8	RM
	Kne extensions	1	12	RM	2	10	90% of 12RM	1	8	RM
	Bench press	1	12	RM	2	10	90% of 12RM	2	8	RM
	Seated row	2	12	RM	2	10	90% of 12RM	1	8	RM
4-6	Close grip pull-down	1	12	RM	2	10	90% of 12RM	2	8	RM
	Shoulder press	1	12	RM	2	10	90% of 12RM	1	8	RM
	Squat	2	10	RM	2	10	90% of 10RM	2	8	RM
	Leg press	2	10	RM	3	10	90% of 10RM	2	8	RM
	Kne extensions	2	10	RM	2	10	90% of 10RM	2	8	RM
7-9	Bench press	2	10	RM	3	10	90% of 10RM	2	8	RM
	Seated row	2	10	RM	2	10	90% of 10RM	2	8	RM
	Close grip pull-down	2	10	RM	2	10	90% of 10RM	1	8	RM
	Shoulder press	2	10	RM	2	10	90% of 10RM	2	8	RM
	Squat	3	10	RM	3	10	90% of 10RM	3	6	RM
10-12	Leg press	3	10	RM	3	10	90% of 10RM	3	6	RM
	Kne extensions	2	10	RM	3	10	90% of 10RM	2	6	RM
	Bench press	3	10	RM	3	10	90% of 10RM	3	6	RM
	Seated row	3	8	RM	3	8	90% of 10RM	3	6	RM
	Close grip pull-down	2	8	RM	3	8	90% of 10RM	3	6	RM
	Shoulder press	2	8	RM	3	8	90% of 10RM	2	6	RM

## Vedlegg III: Western blot-protokoll

Norges idrettshøgskole								Analyselaboratoriet, IFIB	
TITTEL Elektroforese og Western Blot (WB) av muskelhomogenat med precast TGX Stain Free geler med BIO-Rad systemet									
SOP NR.	DATO	UTSKREVET	GODKJENT	TYPE	VEDLEGG	REFERANSE	ERSTATTER	KOPI	SIDE
M-AL 11	01.06.15	IU/HINØ		M-bilag	ingen		ingen	Perm kontorrom	1 av 4

### 1. INNLEDNING

Denne prosedyre beskriver utførelse av SDS PAGE-elektroforese i muskelhomogenat fra menneske, WB og bildebehandling med ChemiDoc MP ved bruk av Stain-Free geler for loading control. Proteinene denatureres for å kunne separere etter molekylvekt.

Metoden benyttes både på helhomogenat og subcellulære fraksjoner (cytosol-, membran-, nuklear- og skjelettfraksjon).

Benytt hanskjer ved behandling av gelene, membranene og prøvene for å beskytte deg selv og hindre kontaminerings.

Alle reagenser og kjemikalier tillages med ultrarent vann Type I, tilsvarende 18.2 MΩ.cm.

Forøvrig henvises til instruksjonsmanualer og hjemmesiden til [www.Bio-Rad.com](http://www.Bio-Rad.com).

### 2. MONTERING AV ELEKTROFORESEKAMMERNE & PRØVEBEHANDLING

- 2.1 Beregg hvor mye 4x Laemmli sample buffer som trengs i oppsettet ditt. Tilsett fersk Dithiothreitol (DTT) til en finale koncentrasjon på 50 mM. (Eks. 8 µl 5M DTT tilsettes 192 µl 4x sample diluent, se kjemikalieoversikt).
- 2.2 10 brønners Stain-Free geler kan tilsettes 50 µl prøve, anbefalt proteinmengde er 10-50 µg/brønn. Benytt Sample Preparation Mal for Bio-Rad, 4x Laemmli.
- 2.3 Prøvene analyseres som duplikat og prøver som skal sammenlignes tilsettes på samme gel.
- 2.4 Prøvene varmes i varmeblokk, 10 min. ved 70 °C.
- 2.5 Som vektmarkør benyttes 5 µl Protein Ladder PS 11 (Cat.no. 310005, GeneON) eller Precision Blue, All Blue Standard (Cat.no. 161-0373, Bio-Rad). Vektmarkorene benyttes ufortynnet og skal ikke varmebehandles.
- 2.6 Vi benytter ferdigstøpte gradientgeler, precast TGX Stain Free GEL, 4 -20 % (Cat.no. 4568094, Bio-Rad). Klipp opp plastikken rundt gelen, fjern tapen på undersiden av gelen og skyv kammen forsiktig ut av brønnene. Sjekk at brønnene er intakte. Skyll brønnene med running buffer, 10x Tris/glycin/SDS Buffer (Cat.no. 161-0732, Bio-Rad).
- 2.7 Monter gelene i gelholderen, med brønsiden inn. Monter en bufferdam-plate dersom det blir en ledig plass i gelholderen til Mini-PROTEAN Tetra Cell.
- 2.8 Ha running buffer i det indre kammet. Ha i nok buffer slik at brønnene fylles med buffer. Ikke overfyll da dette kan føre til bufferlekkasje (hevertprinsippet).
- 2.9 Ved kjøring av 1 eller 2 geler benyttes holderen med bananplugg. Den andre modulen skal ikke plasseres i karet.
- 2.10 Tilsett markør og prøver forsiktig i brønnen med gel loading tips.
- 2.11 Fyll ytterkammer med romtemperert running buffer til merket for 2 eller 4 geler.
- 2.12 Sett på lokket på Mini-Protean systemet. Plugg inn kontaklene, rød i rød (+) og svart i svart (-).
- 2.13 Slå på strømmen på PowerPac HC og juster volt til standard spenning, 200V. Trykk på "Run", kontroller at bufferen begynner å buble og noter strømstyrken (ampere, A). Følg med på vektmarkorene.
- 2.14 Kjør elektroforesen videre etter at bromfenolfronten har gått ut av gelen og evt. markør ≈ 7 kDa som synes i nedre del av gelen, 25 - 45 min.
- 2.15 Slå av strømmen ved endt elektroforese.

### 3. KONTROLL AV LOADING & WESTERN BLOTTING

TITTEL <b>Elektroforese og Western Blot (WB) av muskelhomogenat med precast TGX Stain Free geler med BIO-Rad systemet</b>								
SOP NR.	DATO	UTSKREVET	GODKJENT	TYPE	VEDLEGG	REFERANSE	ERSTATTER	KOPI
M-AL 11	01.06.15	IU/HNO		M-bilag	ingen		ingen	Perm kontorrom 2 av 4

- 3.1 Plasten rundt gelene fjernes ved å benytte et passende verktøy i de fire markerte pilene. Det skal «knase».
- 3.2 Legge plastplaten med markerte tall og gelen i et kar med running buffer.
- 3.3 For å sjekke at alle brønnene har fått tilsatt samme mengde protein aktiveres gelene av UV-lys vha. ChemiDoc Imaging Systemet. UV-lyset aktiverer tryptofan og proteiner som inneholder denne aminosyren vil gi signal.  
*Gel Imaging → Protein Gels → Stain Free Gel → Gel Activation: Good sensitivity (2.5 min)*
- 3.4 Ekvilibrer gelen i kald transferbuffer i 10-15 minutter. Klipp et hakk i det ene hjørnet på gelen for å huske riktig orientering på gelen.
- 3.5 Fukt fiberputene i transferbuffer i 15 minutter.
- 3.6 PVDF benyttes som blotting membran, PVDF kan binde 170-200 µg protein /cm<sup>2</sup>. Klipp et hakk i det ene hjørnet på membranen, nummerering av membranen kan gjøres med en BIC kulepenn.
- 3.7 Aktiver PVDF membranen i metanol i 30 sekunder, skyll kort i H<sub>2</sub>O i 30 sekunder, deretter 2-3 minutter i nytt H<sub>2</sub>O.
- 3.8 Membranen legges deretter i kald transferbuffer i 10-15 minutter.
- 3.9 Sett sammen blottekassetten mini/midi i trauet. Plasser kassetten med den røde siden ned. Legg en fuktet fiberpute på den røde platen. Legg deretter et fuktet filterpapir på fiberputen. Legg membranen på filterpapiret. Membranen legges slik at det avklippte hjørnet kommer øverst til høyre. Legg deretter gelen på toppen av membranen. Når dette hjørnet er opp til høyre betyr dette at *proteinsiden* er på fremsiden av membranen. Bruk en fuktet rulle til å fjerne eventuelle luftbobler og å gi god kontakt mellom gel og membran. Legg deretter på et lag fuktet filterpapir og tilslutt en fuktet fiberpute.
- 3.10 Det er plass til to membraner per kassett.
- 3.11 Lukk kassetten og sett kassetten inn i blotteapparatet, **rødt mot rødt, svart mot svart**.
- 3.12 Sett kjølelementet i holderen (ligger i fryseren). Fyll opp med kald transferbuffer og legg en magnetrører i bunnen på kammeret.
- 3.13 Sett PowerPac HC på 100V, trykk på "run" og blott i 30 minutter under kontinuerlig røring med magnet. Observer strømstyrken ved start og endt blotting. Strømstyrken vil variere med ionestyrke, antall geler m.m.
- 3.14 Slå av strømmen ved endt blotting.
- 3.15 Ta bilde av membran og gel etter blotting vha. ChemiDoc Imaging Systemet.  
*Gel Imaging → Blots → Stain Free Gels → Automatic optimizing...*
- 3.16 Legg membranen i blokkeringslosning (5 % skummet melk i TBS-T) og sett til kontinuerlig, forsiktig rysting i 2 timer ved RT (evt. i 4 °C over natt). Hvis prosedyren avbrytes etter blotting kan membranen pakkes inn i plast, men først må overflodig væske torkes bort med filterpapir. Membranen lagres i eksikator ved 4°C.

#### 4. INKUBERING AV PRIMÆRT (1 Ab.) OG SEKUNDÆRT (2 Ab.) ANTISTOFF

- 4.1 Etter blokkering skylles membranene raskt i 2 x TBS-T, deretter 2 x 2 min. i TBS-T på en bordvippe. Ved all vasking tilsettes ≥ 4 ml vaskebuffer per cm<sup>2</sup> membran.
- 4.2 Lag en 1 % skummet melkeløsning i TBS-T.
- 4.3 Fortynn primært antistoff i 1 % skummet melkeløsning. Fortynningen av antistoffet varierer for hvert antistoff. *Eksempel: Antistoff mot HSP70 (Cat#ADI-SPA-810-F, Enzo) fortynnes 1:4000, 5 µl 1Ab tilsettes i 20 ml 1 % skummet melkeløsning i TBS-T.*
- 4.4 Inkuber membranene med 1 Ab. over natt i 4 °C med kontinuerlig, svak rysting.

<b>TITTEL</b> <b>Elektroforese og Western Blot (WB) av muskelhomogenat med precast TGX Stain Free geler med BIO-Rad systemet</b>								
SOP NR.	DATO	UTSKREVET	GODKJENT	TYPE	VEDLEGG	REFERANSE	ERSTATTER	KOPI
M-AL 11	01.06.15	IU/HNO		M-bilag	ingen		ingen	Perm kontorrom 3 av 4

- 4.5 Etter inbubering med 1. Ab skylles membranene raskt i 2 x TBS-T, deretter 1 x 15 min. i TBS-T og til slutt 3 x 5 min. i TBS. Antistoffet kan gjenbrukes opptil fire ganger.
- 4.6 Fortynn 2. Ab i 1 % skummet melkeløsning. *Eksempel: HSP-membranene inkuberes med Goat-anti-mouse. Benytt fortynningen 1:30 000, 2 µl 2 Ab. tilsettes i 60 ml 1 % skummet melkeløsning i TBS-T.* Membranene inkuberes i 1 time med kontinuerlig, svak rysting i RT.
- 4.7 Etter inkubering med 2. Ab skylles membranene raskt i 2 x TBS-T, deretter 1 x 15 min. i TBS-T og til slutt 3 x 5 min. i TBS.

##### 5. DETEKSJON

- 5.1 Deteksjonsreagensene består av to reagenser. Reagens B er lysomfintlig.
- 5.2 Bland reagensene likt, 1 del A (5 ml) og 1 del B (5 ml).
- 5.3 Bruk en flat teflonbelagt pinsett (grønn) og fjern overflødig vaskebuffer fra membranen. Legg membranen med proteiniden opp på glassplaten på ChemiDoc Imaging Systemet, unngå luftbobler under membranen. Påfør en hinne med Super Signal og lukk skuff og dør og la membranen inkubere i 5 min.
- 5.4 Eksponeringstiden kan variere. Bruk autofunksjonen på ChemiDocen for å få et optimalt bilde. Super Signal Substrate er holdbar i inntil 24 timer etter blanding av reagens A og B.
- 5.5 Proteinene kan kvantifiseres ved hjelp av Image Lab 4.1 software (BioRad).
- 5.6 Benytt **Volume Tools → Rectangle** → lag en rektangel rundt et av båndene → marker firkanten → Ctrl C → Ctrl V(til antall rektangler stemmer med antall bånd). Det er viktig at rammen på rektangelet ikke dekker nabo-båndene.
- 5.7 Velg *Analysis table*.
- 5.8 Kopier resultatene inn i eget Excel regneark.



