

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.- Prof. Dr. Martina Krüger

Einfluss kardialer Ischämie auf die passive Skelettmuskelfunktion von Mäusen mit und ohne diabetischer Stoffwechsellage

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nora Sybille Kahmann

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Nora Sybille Kahmann

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Schmitt

I. Zusammenfassung

Das Protein Titin stellt neben den Proteinen Myosin und Aktin einen wichtigen Bestandteil des Sarkomers dar. Es ist das größte Protein des menschlichen Körpers. Seine Funktion besteht zum einen darin, das Sarkomer in der richtigen Position zu halten und zum anderen sind die einzelnen Bestandteile des Titins für die spezifische passive Spannung einer Muskelfaser verantwortlich. Eine wichtige Funktion der passiven Spannung ist das Zurückführen des Filaments in seine Ausgangsposition nach Kontraktion. Die Eigenschaften des Proteins können durch posttranslationale Modifikationen verändert werden. Diese Modifikationen werden mitunter durch Veränderung der Stoffwechsellage im Gewebe induziert, wie zum Beispiel im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes oder eines Diabetes mellitus Typ 2. Der Einfluss dieser beiden Erkrankungen auf das skelettale Titin ist Thema der vorliegenden Studie. Sie stehen im Fokus der Untersuchungen, da sowohl der Diabetes mellitus Typ 2 als auch der akute Myokardinfarkt Krankheiten mit hoher Prävalenz in Deutschland darstellen. Sie können zu multiplen Veränderungen an der quergestreiften Muskulatur führen, woraus wiederum eine gesteigerte Morbidität und Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Menschen resultiert.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Ischämie am Herzen sowie eine diabetische Stoffwechsellage Einfluss auf das Titin der Skelettmuskulatur durch posttranslationale Modifikationen, wie der Phosphorylierung, nehmen. Genauer gesagt wird in der Studie das Phosphorylierungslevel an den Positionen Ser11878 und Ser12022 innerhalb der PEVK-Region des Proteins erhoben. Weiterführend wird untersucht, ob ein verändertes Phosphorylierungslevel Einfluss auf die Eigenschaften des Sarkomers hat. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird Psoasmuskulatur von Mäusen mit induzierter 60-minütiger Ischämie und anschließender 24-stündiger Reperfusionzeit (I/R) mit Gewebeproben ohne I/R verglichen. Zusätzlich wird zwischen Mäusen unterschieden, bei denen eine homozygote Punktmutation des Leptin-Rezeptors (db/db), und damit eine diabetische Stoffwechsellage vorliegt und solchen, bei denen lediglich eines der beiden Gene eine Punktmutation (db/+) aufweist und damit keine Beeinflussung durch eine diabetische Stoffwechsellage besteht. Hierbei zeigt sich, dass bei den diabetischen Mäusen ein signifikant verringertes Phosphorylierungslevel am Serinrest Ser11878 im Vergleich mit den nicht diabetischen Kontrollgruppen vorliegt. In den Gewebeproben der Mäuse mit I/R im Vergleich mit den Mäusen ohne I/R kommt es hingegen zu einer Erhöhung des Phosphorylierungslevels an der Position Ser11878, bislang jedoch ohne Signifikanznachweis. Im Rahmen der vorliegenden Studie wird zudem die Kinaseaktivität der Protein-kinase-C-alpha erhoben, welche keine eindeutigen Signifikanzen aufweist. Neben dem Phosphorylierungslevel wird zusätzlich die Veränderungen der längenabhängigen passiven Spannung der verschiedenen Versuchsgruppen miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass die I/R-Mäuse eine gesteigerte Entwicklung der passiven Spannung im Vergleich mit den Mäusen ohne I/R aufweisen, unabhängig davon ob bei den Versuchsgruppen eine diabetische oder nicht-diabetische Stoffwechsellage vorliegt. Die Vermutung liegt demnach nahe, dass weitere bisher noch nicht erforschte posttranslationale Modifikationen Einfluss auf die Entwicklung der passiven Spannung im Skelettmuskel haben.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es herauszufinden, ob Tiere unter diabetischer Stoffwechsellage über dieselben Kompensationsmechanismen nach akutem Myokardinfarkt verfügen wie solche ohne einen Diabetes mellitus Typ 2. Die Ergebnisse dieser Studie könnte längerfristig zu neuen Therapieansätzen beitragen.

II. Summary

The protein titin is an important component of the sarcomere along with the proteins myosin and actin. It is the largest protein in the human body. Its function is, on the one hand, to keep the sarcomere in the correct position and, on the other hand due to the individual components of the protein, to create the specific passive tension of a muscle fibre. An important function of passive tension is to return the filament to its original position after contraction. The characteristics of the protein can be changed by posttranslational modifications. These modifications can be induced by changes in the metabolic situation in the tissue, such as in the context of acute myocardial infarction or diabetes mellitus type 2. The influence of these two diseases on skeletal titin is the subject of the present study. They are the focus of the researches as both, diabetes mellitus type 2 and acute myocardial infarction, are diseases with a high prevalence in Germany. They can lead to multiple changes in the striated musculature, resulting in increased morbidity and reduced quality of life for the people who are affected.

The present dissertation deals with the question of whether cardiac ischaemia and diabetic metabolic conditions have an influence on the titin of the skeletal musculature through post-translational modifications such as phosphorylation. More specifically, the study will assess the level of phosphorylation at positions Ser11878 and Ser12022 within the PEVK region of the protein. Further, it is investigated whether a modified phosphorylation level has an influence on the characteristic of the sarcomere. In the context of this dissertation, psoas muscles of mice with induced 60-minute ischemia followed by a 24-hour reperfusion time (I/R) are compared with tissue samples without I/R. In addition, a distinction is made between mice in which a homozygous point mutation of the leptin receptor (db/db) leads to a diabetic metabolic state and those in which only one of the two genes has a point mutation (db/+) which means that there is no influence by a diabetic metabolic state. It was shown that the diabetic mice showed a significantly reduced phosphorylation level at the serine residue Ser11878 compared to the non-diabetic control groups. In the tissue samples of the mice with I/R compared to the mice without I/R, however, there is an increase in the phosphorylation level at the position Ser11878, but so far without any evidence of significance. In the present study, the kinase activity of protein kinase C- α is also determined, which does not show clear significance. In addition to the phosphorylation level, the changes in the length-dependent passive tension of the different experimental groups will be compared. It is shown that the I/R mice show an increased development of the passive tension compared to the mice without I/R, regardless of whether the experimental groups have a diabetic or non-diabetic metabolic state. It can therefore be assumed that further post-translational modifications, which have not yet been investigated, have an influence on the development of passive tension in skeletal muscle.

The aim of the present studies is to find out whether animals with diabetic metabolic status have the same compensation mechanisms after acute myocardial infarction as animals without diabetes mellitus type 2. The results of this study could contribute to new therapeutic approaches in the longer term.

III. Abkürzungsverzeichnis

Name	Bedeutung
A	Ampere
A-Bande	anisotrope Bande
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATE	Arginyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
Bzgl.	bezüglich
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
$\text{CaMKII}\delta$	Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II delta
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
db/+	Leptinrezeptor-defiziente-heterozygote Maus
db/db	Leptinrezeptor-defiziente-homozygote Maus
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
Erk1/2	extracellular signal regulated kinase 1/2
et al.	et alii (lat. und andere)
Evtl.	eventuell
g	Gramm
GLUT 2	Glukosetransporter 2
GLUT 4	Glukosetransporter 4
h	Stunden
H ⁺	Wasserstoff
HCL	Chlorwasserstoff
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
H ₂ O	Wasser
HRP-Enzym	Horseradish Peroxidase Enzym
H-Zone	Hensen-Zone
I-Bande	isotrope Bande
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
I/R	Ischämie/Reperfusion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter

LAD	left anterior descending artery (absteigender Ast der linken Koronararterie)
LDL	Low-Density-Lipoproteine
MDa	Megadalton
μ	mikro
M	Molar
m	mili
mm	milimeter
M-Bande	mittlere Bande
μm	Mikrogramm
mg	Miligramm
MMP	Matrix Metalloproteinase
n	Nano
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ⁺ /K ⁺ -Pumpe	Natrium-Kalium-Pumpe
NO	Stickstoffmonoxid
P	Phosphat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G
PEVK	Prolin Glutaminsäure Valin Lysin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezien

s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sham	Schein-
SR	Sarkoplasmatische Retikulum
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (mit 0,1% Tween)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
us	unique Sequenzen
V	Volt
Z-Streifen/Linie	Zwischen-Streifen/Linie
%	Prozent

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Skelettmuskulatur.....	1
1.1.1	Struktureller Aufbau.....	1
1.1.2	Struktureller Aufbau der Herzmuskulatur im Vergleich zum Skelettmuskel.....	5
1.2	Myokardinfarkt.....	5
1.2.1	Entstehung eines Myokardinfarktes und seine Folgen.....	5
1.2.2	Bisher bekannte pathologische Veränderungen der Skelettmuskulatur in Folge eines Myokardinfarktes.....	7
1.3	Diabetes mellitus Typ 2	8
1.3.1	Pathophysiologie und Einteilung des Diabetes mellitus	8
1.3.2	Überblick über die Effekte von Insulin auf den Stoffwechsel.....	8
1.3.3	Diabetes mellitus Typ 2 und sein Einfluss auf das Geschehen eines akuten Myokardinfarkts	10
1.4	Titin	
1.4.1	Aufbau und molekulare Struktur	12
1.4.2	Mögliche Modifikationen von Titin auf molekularer Ebene und die daraus resultierende Veränderung der passiven Spannung	13
1.4.3	Bereits erforschte Modifikationen des Titinproteins in Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt und unter diabetischer Stoffwechsellage .	14
1.5	Ziele der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Laborutensilien.....	18
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	19
2.1.3	Reagenzien.....	20
2.1.4	Antikörper.....	21
2.1.5	Maus Skelettmuskulatur Proben.....	22
2.1.6	Biochemische Methoden	24
2.1.7	Biophysikalische Methoden	26
2.1.8	Analyse der Daten.....	28
2.1.9	Software.....	28
3	Ergebnisse	29

3.1	Modifikation der Phosphorylierung der PEVK Region sowie des Aktivierungsloops der PKC α im Titin der Psoasmuskulatur	29
3.1.1	Unterschied des Phosphorylierungsstatus in der Titin PEVK-Region der diabetischen Versuchstiere (db/db) bezogen auf die nicht-diabetischen Versuchstiergruppen (db/+).....	29
3.1.2	Darstellung des veränderten Phosphorylierungslevels der Versuchstiergruppen in Folge eines akuten Myokardinfarkts	30
3.1.3	Aktivität der Proteinkinase-C- α (PKC α)	31
3.1.4	Überblick über die Mittelwerte \pm Standardfehler der einzelnen Versuchsgruppen, die auf dem Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloops an der Position T497 der PKC α sowie der Phosphorylierung der PEVK Region an den Stellen Ser11878 und Ser12022 beruhen.....	33
3.2	Titin-abhängige Veränderung der passiven Spannung im Skelettmuskel unter diabetischer Stoffwechsellage und nach akutem Myokardinfarkt	34
3.2.1	Titin-abhängige passive Spannung im Skelettmuskel der diabetischen Versuchstiere (db/db) verglichen mit den nicht-diabetischen Versuchstiergruppen (db/+).....	35
3.2.2	Titin-abhängige Veränderung der passiven Spannung im Skelettmuskel nach 60-minütiger Ischämie und anschließender 24-stündiger Reperfusion (I/R).....	36
4	Diskussion.....	40
4.1	Einfluss eines Typ-2-Diabetes auf das Phosphorylierungslevel der PEVK-Region und der PKC α -Aktivität im Titin der Skelettmuskulatur.....	40
4.2	Fehlende Veränderung der Titin-abhängigen passiven Spannung im Skelettmuskel durch einen Typ-2-Diabetes	41
4.3	Ischämische Modulation des Phosphorylierungsstatus der PEVK-Region und sein Einfluss auf die Veränderung der Titin-abhängigen passiven Spannung der Skelettmuskulatur.....	43
4.3.1	Möglicher physiologischer Vorteil der I/R-Skelettmuskelproben auf Grund der detektierten gesteigerten passiven Spannung	45
4.3.2	Weiterführende Untersuchungen bezüglich eines postischämisch gesteigerten oxidativen Stresslevels und seinem Einfluss auf die Skelettmuskulatur.....	47
4.4	Einfluss der PKC α sowie möglicher anderer Kinasen auf die Phosphorylierung der PEVK-Region des skelettalen Titins und ihre Beeinflussung durch eine veränderte Zytokin-IL6-Konzentration.....	48
4.5	Schlussfolgerung.....	52
	Literatur- und Quellenverzeichnis	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Laborutensilien.....	19
Tabelle 2 Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 3 Reagenzien.....	21
Tabelle 4 Antikörper.....	22
Tabelle 5 Bradford-Methode.....	24
Tabelle 6 Zusammensetzung der 1,9%-, 2,1%-, 2,3%-Agarose-stabilisierten SDS-Polyacrylamid-gele zur Analyse von Titin.....	25
Tabelle 7 Zusammensetzung der 10%-, 12,5%-, 15%- SDS-Polyacrylamid-Trenngele sowie des 4% Sammelgels zur Analyse der PKC α	25
Tabelle 8 Darstellung der errechneten Mittelwerte \pm Standardfehler, die auf dem Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloops an Position T497 der PKC α sowie der Phosphorylierung der PEVK-Region an den Positionen Ser11878 und Ser12022 beruhen.....	33
Tabelle 9 Darstellung der Mittelwerte der passiven Spannung der db/+ sham- und db/db sham-Muskelfaserproben bei Dehnung um zusätzlich 10%-50% der Ausgangslänge.....	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Bindegewebige Strukturen der Skelettmuskulatur (Abbildung modifiziert nach https://smart.servier.com/).....	1
Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Sarkomers..	2
Abbildung 3 Lage des Titinproteins (blau) innerhalb eines Sarkomers.	3
Abbildung 4 Vereinfachte und schematische Darstellung einer erschlafften (A), einer kontrahierten (B) und einer passiv gedehnten Sarkomereinheit (C)..	4
Abbildung 5 Überblick über die Effekte von Insulin auf den Stoffwechsel.....	9
Abbildung 6 Schematischer Aufbau des skelettalen Titinproteins.	13
Abbildung 7 Fasermessapparatur MYOSCOPE-SKINNED der Firma Myotronic Heidelberg.....	27
Abbildung 8 Beispiel einer passive Längenveränderung einer Muskelfaser des M. psoas..	28
Abbildung 9 Phosphorylierungsstatus der Titin PEVK-Region im Skelettmuskel nach induziertem Myokardinfarkt und unter diabetischer Stoffwechsellaage. t.....	31
Abbildung 10 Darstellung des Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloop T497 der PKC α	32
Abbildung 11 Beispiel eines Dehnungsprotokolls für die stufenweise Längenänderung einer Muskelfaser des M. psoas.....	34
Abbildung 12 Beispiel der passiven Kraftentwicklung einer Muskelfaser des M. psoas....	34
Abbildung 13 Veränderung der passiven Spannung im Psoasmuskel bei Dehnung.....	37
Abbildung 14 Vergleich der Entwicklung der passiven Spannung im Psoasmuskel der I/R-Gruppen bezogen auf ihre sham-Gruppen bei einer zusätzlichen Dehnung um 30%, 40% und 50% der Ausgangslänge.	38

1 Einleitung

1.1 Skelettmuskulatur

1.1.1 Struktureller Aufbau

Als Skelettmuskulatur werden all jene Muskeln bezeichnet, die willkürliche Bewegungen ausführen. Die einzelnen Anteile des Skelettmuskels werden durch verschiedene Faszienschichten zusammengehalten. Eine einzelne Muskelfaser wird vom sogenannten Endomysium umhüllt, mehrere zusammengelagerte Fasern sind vom Perimysium umgeben und der Muskel in seiner Gesamtheit wird nochmals vom Epimysium bedeckt (siehe Abbildung 1 (Abb.1)) (Junqueira, 2005, pp. 146-148).

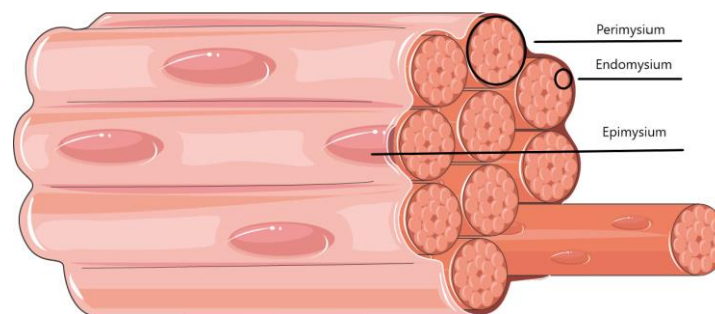


Abb. 1 Bindegewebige Strukturen der Skelettmuskulatur (Abbildung modifiziert nach <https://smart.servier.com/>)

Die Skelettmuskulatur besteht aus quergestreifter Muskulatur. Der Ausdruck ‚quergestreift‘ basiert dabei auf ihrem lichtmikroskopischen Bild. Eine Muskelfaser besteht aus vielen Myofibrillen, deren kleinste Untereinheit das Sarkomer bildet. Die regelmäßige Anordnung der Myofibrillen innerhalb einer Muskelfaser bedingt letztendlich das Bild der Querstreifung. Hierbei lässt sich ein abwechselndes Muster von hellen und dunklen Streifen erkennen.

Zur besseren Veranschaulichung des Aufbaus eines Sarkomers siehe Abbildung 2 (Abb.2). Hier wird deutlich, dass eine Sarkomereinheit aus einer A-Bande besteht, in deren Mitte sich die H-Zone und der M-Streifen befinden sowie aus jeweils zwei halben I-Streifen, die sich an beide Seiten der A-Bande anschließen. Die äußere Begrenzung eines Sarkomers stellt der Z-Streifen dar, der gleichzeitig die Mitte einer I-Bande darstellt.

Als A-Bande, wird der im lichtmikroskopischen Bild dunkel erscheinende Streifen bezeichnet. Sie ist doppelbrechend (anisotrop) im Polarisationsmikroskop. Die A-Bande enthält unter anderem die Myosinfilamente, welche in der Mitte durch den sogenannten M-Streifen zusammengehalten werden. Der Bereich innerhalb der A-Bande, der ausschließlich Myosin und kein Aktin enthält, wird als H-Zone bezeichnet (lichtmikroskopisch heller Streifen innerhalb der A-Bande, in dessen Mitte der M-Streifen wieder dunkel erscheint). Die I-Bande ist hingegen für die helle Querstreifung im lichtmikroskopischen Bild zwischen den A-Banden verantwortlich. Sie ist einfachlichtbrechend (isotrop) im Polarisationsmikroskop und enthält ausschließlich Aktin (Welsch, 2018, pp. 154-155). In der Mitte der I-Bande befindet sich der bereits oben erwähnte Z-Streifen. Hier werden die gegenüberliegenden Aktinfilamente miteinander verbunden.

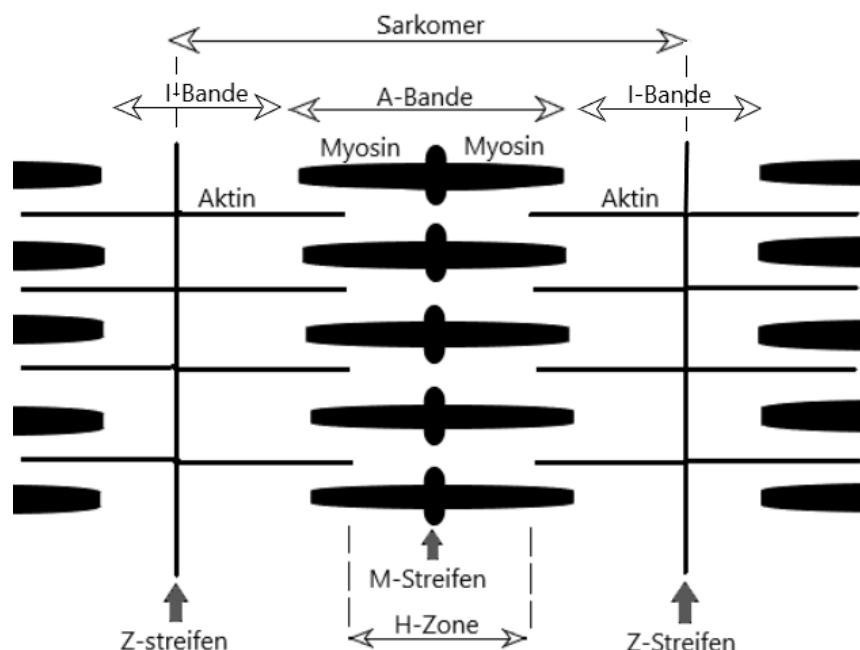


Abb. 2 Schematische Darstellung eines Sarkomers. Die Abbildung zeigt den schematischen und stark vereinfachten Aufbau einer Sarkomereinheit. Eine Sarkomereinheit wird beiderseits durch den Z-Streifen begrenzt. Der Z-Streifen stellt die Verbindung der gegenüberliegenden Aktinfilamente dar. Sie werden unter anderem mithilfe von Alpha-Aktinin verknüpft. Den Bereich, der ausschließlich Aktin und kein Myosin enthält und dessen Mittelpunkt der Z-Streifen bildet, bezeichnet man als I-Bande (isotrop). Den Bereich, der hauptsächlich Myosinfilamente enthält, teilweise überlappend mit Aktinfilamenten, wird A-Bande genannt (anisotrop). Der Mittelpunkt der A-Bande stellt der M-Streifen dar. Dieser wird durch die Verbindung der gegenüberliegenden Myosinfilamente miteinander gebildet. Diese Verbindung wird unter anderem mit Myomesin, einem Strukturprotein, hergestellt. Die H-Zone stellt den Bereich dar, der durch Myosin ohne Überlappung mit Aktin gebildet wird. Er ist als heller Streifen im lichtmikroskopischen Bild zu erkennen, durchbrochen von dem dunkleren M-Streifen in seiner Mitte.

Eine Sarkomereinheit ist die kleinste funktionelle Untereinheit einer Myofibrille. Die bereits oben beschriebenen Aktin- und Myosinfilamente stellen mit Titin die Hauptbestandteile eines Sarkomers dar. Die Position des Titinproteins innerhalb eines Sarkomers ist vereinfacht in Abb. 3 veranschaulicht. Titin ist ein Protein, welches im A-Banden Bereich eng an Myosin und das Myosin-bindende Protein C assoziiert ist. Es stabilisiert das Myosinfilament vor allem beim Kontraktionsvorgang und reicht bis zum M-Streifen (Lange, Ehler, & Gautel, 2006). Neben der Funktion als Gerüstprotein, welches unter anderem zur Verankerung des Myosinfilaments im Zentrum des Sarkomers dient, stellt es auch dessen Verbindung zur Z-Linie her. Es ist dabei wie eine frei verlaufende Sprungfeder im I-Banden-Teil des Sarkomers angeordnet. Der I-Banden-Anteil stellt den elastischen Anteil des Titinproteins dar. Er kann reversibel bei Dehnung verlängert werden und ist damit maßgeblich für die passiven Eigenschaften des Myosinfilaments verantwortlich (Krüger & Linke, 2011). Die elastischen Rückstellkräfte von Titin führen außerdem dazu, dass das Myosin nach dem Kontraktions-

vorgang des Muskels wieder in seine Ausgangsposition zurückgeschoben wird. Titin durchzieht also folglich ein halbes Sarkomer und ist sowohl Gerüst- als auch Elastizitätsprotein (Welsch, 2018, pp. 156-159).

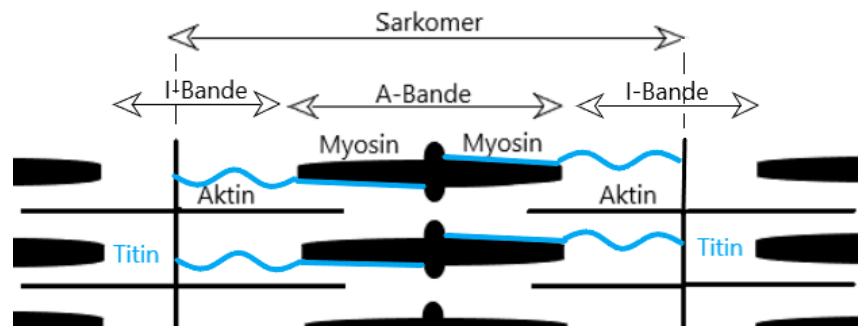
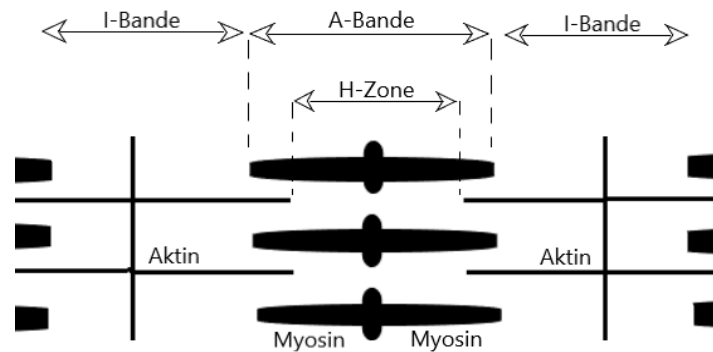


Abb. 3 Lage des Titinproteins (blau) innerhalb eines Sarkomers. Vereinfachte und schematische Darstellung des Titinproteins. Dieses dient innerhalb der A-Bande als Gerüstprotein für das Myosinfilament und ist hier eng mit diesem assoziiert. Innerhalb des I-Banden-Anteils hat es hingegen die Konfiguration einer Sprungfeder. Seine elastischen Rückstellkräfte führen dazu, dass das Myosinfilament nach dem Kontraktionsvorgang wieder in seine Ausgangsposition zurückgeführt wird. Es durchspannt eine halbe Sarkomerlänge vom M-Streifen bis zur Z-Scheibe. Aufgrund der vereinfachten Darstellung wurde das Protein Titin nicht bei den angeschnittenen Sarkomerabschnitten eingezeichnet.

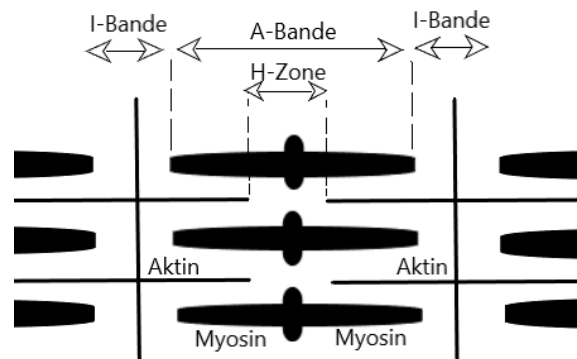
Das Aktin-Filament besteht aus zwei Aktinketten. Diese winden sich als Helix umeinander und werden durch Nebulin, ein Strukturprotein, stabilisiert. Des Weiteren sind dem Aktinfilament die Regulatorproteine Tropomyosin und Troponin angelagert. Diese sind für die Einleitung des Kontraktionsvorgangs von Bedeutung. Das Myosin besteht aus zwei schweren Ketten (*heavy chains*) sowie vier leichten Ketten (*light chains*). Die schwere Kette beinhaltet dabei die Kopfdomäne des Myosins, welche an Aktin bindet und auch als Motordomäne bezeichnet wird, da es hier zur Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat + Phosphat (ADP+P) kommt was wiederum zu einem Kraftausschlag führt. Die Nacken- und Schwanzdomäne der schweren Kette beinhaltet unter anderem die Bindedomänen für die leichten Ketten des Myosins welche zum einen die motorische Aktivität des Proteins regulieren (*regulatory light chain*) und zum anderen strukturelle (*essential light chain*) Eigenschaften mit sich bringen (Heinrich, 2014).

Bei der aktiven Kontraktion (siehe Abb. 4B) kommt es zu einer Verkürzung der I-Bande, da das Aktinfilament entlang des Myosinfilaments in Richtung M-Streifen bewegt wird. Die Überlappung der beiden Filamente nimmt folglich zu. Dabei werden sowohl die I-Bande als auch die H-Zone verkürzt, die A-Bande bleibt in seiner Länge unverändert. Nach der aktiven Kontraktion und dem Zurückkehren des Sarkomers in seine Ruhelage nehmen die I-Bande und die H-Zone wieder ihre Ausgangslänge an (siehe Abb. 4A). Kommt es zu einer passiven Dehnung des Muskels, führt dies zu einer zusätzlichen Verlängerung der I-Bande sowie der H-Zone. Bei der passiven Dehnung spielt das Protein Titin eine wichtige Rolle. Da ein Muskel prinzipiell soweit gedehnt werden kann bis seine Aktin- und Myosinfilamente nicht mehr überlappen, werden die Rückstellkräfte des elastischen Titins dazu benötigt, den Muskel wieder in seine Ruhelage zu überführen (siehe Abb. 4C) (Welsch, 2018, pp. 157-160).

A)



B)



C)

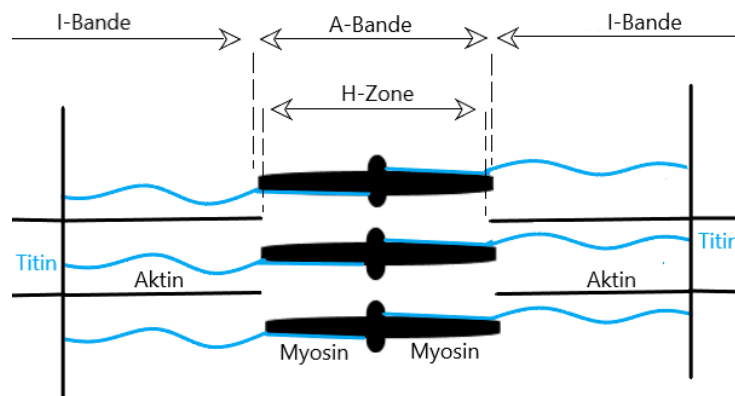


Abb. 4 Vereinfachte und schematische Darstellung einer erschlafften (A), einer kontrahierten (B) und einer passiv gedehnten Sarkomereinheit (C). Abb. A stellt schematisch eine Sarkomereinheit im Ruhezustand, Abb. B im kontrahierten Zustand, dar. Beim aktiven Kontraktionsvorgang wandert das Aktinfilament entlang des Myosinfilaments in Richtung M-Bande. Dabei kommt es zu einer Verkürzung der I-Bande und der H-Zone bei gleichbleibender A-Bande. Abb. C stellt die passive Dehnung einer Sarkomereinheit dar. Bei diesem Vorgang spielt das dritte Filament des Sarkomers, das Protein Titin (blau dargestellt), eine entscheidende Rolle. Der I-Banden-Anteil des

Titins wird dabei gedehnt. Ein Sarkomer kann prinzipiell soweit gedehnt werden, dass das Aktinfilament und das Myosinfilament sich fast nicht mehr überlappen. Dabei kommt es zu einer Verbreiterung der I-Bande bei gleichbleibender A-Bande. Die H-Zone ist bei maximaler Dehnung fast so groß wie die A-Bande.

1.1.2 Struktureller Aufbau der Herzmuskulatur im Vergleich zum Skelettmuskel

Der Aufbau der Herzmuskelfasern ähnelt denen der Skelettmuskulatur. Dennoch gibt es Unterschiede. Der Herzmuskel ist kein bewusst ansteuerbarer Muskel und wird somit nicht über dasselbe Nervensystem wie die Skelettmuskulatur innerviert. Es verfügt über ein eigenes Erregungsleitungssystem. Die Erregungsförderung der im Herzen generierten Aktionspotentialen erfolgt von Zelle zu Zelle und nicht mit Hilfe von Nervenfasern. Damit diese Art der Erregungsförderung zwischen den Zellen sichergestellt werden kann, muss ein enger Zellkontakt vorliegen. Auf Grund dessen werden Kardiomyozyten durch Gap junctions, Adhärens Kontakt und Desmosomen zusammengehalten. Gap junctions verbinden die Kardiomyozyten in ihrer Längsausrichtung. Transversal werden die Zellen durch Adhärens-Kontakte mit inserierenden Aktinfilamenten oder aber durch Desmosomen mit inserierendem Desmin zusammengehalten. Dadurch entstehen die charakteristischen Glanzstreifen im lichtmikroskopischen Bild des Herzmuskels (Lüllman-Rauch, 2019, pp. 287-289). Weitere Unterschiede zwischen den Muskelfasertypen betreffen zudem den Zellkern und das Stabilisierungsprotein der Aktinfilamente. Während Skelettmuskelfasern mehrere periphere Zellkerne enthalten und seine Aktinfilamente durch das Protein Nebulin stabilisiert werden, zeichnen sich Kardiomyozyten durch einen einzelnen zentralen Zellkern aus und die Stabilisierung ihrer Aktinfilamente erfolgt durch das Protein Nebulette. Zuletzt ist der besondere Stellenwert des Titinproteins innerhalb des Zyklus der Herzaktion zu erwähnen. Während der Herzaktion kommt es abwechselnd zur Diastole, während derer es zur Füllung der Ventrikel mit Blut kommt und dadurch zur passiven Dehnung der Kardiomyozyten, und der Systole mit aktiver Kontraktion der Kardiomyozyten. Während der Systole wird das Blut in den Lungen- und Körperkreislauf gepumpt. Bei diesem stetigen Wechsel von aktiver Kontraktion und passiver Dehnung nimmt das Titinprotein eine Schlüsselrolle ein. Auf Grund seiner bereits oben erläuterten elastischen Eigenschaften, führt es den passiv gedehnten Muskel nach der Diastole wieder in seine Ausgangsposition zurück, welche Voraussetzung für den darauf folgenden Kontraktionsvorgang während der Systole ist (Helmes et al., 2003; Lüllman-Rauch, 2019, pp. 275-276; Welsch, 2018).

1.2 Myokardinfarkt

1.2.1 Entstehung eines Myokardinfarktes und seine Folgen

Der Myokardinfarkt zählt zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Bundesamt). Weltweit ist er mit einer Inzidenz von 100.000/Jahr eine weit verbreitete Erkrankung, unter dessen Folgen viele Menschen zu leiden haben (Herold, 2019, p. 250). Insofern ist das Verständnis der pathologischen Ereignisse nach Erleiden eines akuten Myokardinfarkts von

großer Bedeutung, um die anschließende Morbidität der Menschen und damit ihren Leidensdruck auf lange Sicht zu verringern.

Ein Myokardinfarkt basiert auf der Minderversorgung der Herzmuskulatur mit Sauerstoff. Ein Sauerstoffmangel entsteht durch eine Minderversorgung der Koronargefäße mit Blut. Durch einen Sauerstoffmangel von über 15 Minuten entstehen permanente Schäden am Myokard (Aaronson PI, 2013, pp. 88-89). Zu einem Verschluss der Herzkranzgefäße und damit zur Unterversorgung des Myokards mit dem nötigen Sauerstoff kann es auf mehrere Arten kommen. Der Hauptanteil der ischämischen Myokardinfarkte entsteht aufgrund des thrombotischen Verschlusses eines Herzkranzgefäßes bei vorliegender Atherosklerose (Grundmann, 2014, pp. 278-279). Atherosklerose entsteht zunächst durch endotheliale Dysfunktion, also Belastung und Schädigung der Gefäße aufgrund von Risikofaktoren wie der Hypertonie, der Hyperlipidämie, dem Nikotinabusus oder dem Vorliegen eines Diabetes mellitus. Anschließend kommt es durch erhöhte Permeabilität der Gefäßwand zur Einwanderung von Low-Density-Lipoproteine (LDL) in die Intima der Gefäßwand, wobei hier die LDLs oxidiert werden. Es kommt zur systemischen Entzündungsreaktion. Durch die Stimulation der Epithelzellen kommt es des Weiteren zur Expression von Adhäsionsmolekülen. Außerdem setzt das oxidierte LDL Wachstumsfaktoren und Chemokine frei, was darauffolgend wiederum zu:

1. der Einwanderung von Monozyten und deren Umwandlung zu Makrophagen führt. Das oxidierte LDL in der Intima wird daraufhin von den Makrophagen aufgenommen und in Vakuolen im Zytoplasma gespeichert, es entstehen die sogenannten Schaumzellen.
2. der Einwanderung von Lymphozyten und weiterer Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren (INF-gamma, IL 6, bFGF), die zur Entzündungsreaktion der entstehenden Plaques führen.
3. der Einwanderung von glatten Muskelzellen. Infolge dessen kommt es zu einer gleichzeitigen Bildung von extramedullärer Matrix durch die eingewanderten Muskelzellen und einer Hemmung der Kollagenbildung durch das von den glatten Muskelzellen ausgeschüttete INF-gamma, was zusätzlich durch die von den Makrophagen gebildeten Kollagenasen unterstützt wird.

Es folgt eine Instabilität des entstehenden Plaques. Kommt es nun zu einer Plaqueruptur, lagern sich Thrombozyten aufgrund des frei gewordenen Tissue-Factors an die oberflächlichen Kollagenfasern an, woraus ein akuter Verschluss des Gefäßlumens resultiert (Böcker et al., 2012, pp. 399-401). Seltener Ursachen, die ebenfalls zu einem Verschluss der Herzkranzgefäße führen können, sind zudem eine Entzündung der Gefäße oder eine Einblutungen in atherosklerotische Gefäßveränderungen (Grundmann, 2014).

Als Folge des oben beschriebenen pathophysiologischen Vorgangs entwickelt sich nach 10-15 Minuten eine irreversible Schädigung des Myokards, die einen Zelluntergang der Herzmuskulatur zur Folge hat (Aaronson PI, 2013). Es kommt zum nekrotischen Untergang der Myozyten, und dadurch zur Freisetzung von lysosomalen und mitochondrialen Enzymen sowie von Entzündungsmediatoren, die lokal eine Entzündungsreaktion hervorrufen (Böcker et al., 2012, p. 381). Außerdem kann es bei der oben beschriebenen Endothel-Dysfunktion auch zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit CRP- Erhöhung kommen (Böcker et al., 2012, p. 400). Akute Folgen des Myokardinfarktes sind unter anderem der kardiogene Schock, Herzrhythmusstörungen oder ein Papillarmuskelabriss. Einige Tage

nach einem akuten Myokardinfarkt kann es des Weiteren zu einer Herzwandruptur mit Perikardtamponade, einem Herzwandaneurysma, das wiederum Thromben begünstigt, oder auch einem Reinfarkt kommen (Böcker et al., 2012, pp. 382-383). Jede dieser Komplikationen kann zum Tod oder im Falle eines Überlebens auf Dauer zu einer Minderfunktion des Herzens, und somit zu einer Herzinsuffizienz führen. Eine Herzinsuffizienz zeichnet sich durch eine verminderte Pumpleistung des Herzens aus. Je nach Ausmaß der resultierenden Herzinsuffizienz kann keine adäquate Versorgung der Organe und Gewebe mehr, darunter auch der Skelettmuskulatur, mit Blut erfolgen. Dies führt zu unterschiedlichsten Beschwerdebildern der Patienten. Bezüglich der Skelettmuskulatur klagen Betroffene beispielsweise über Muskelschwäche und eine geringere Muskelbelastbarkeit (Williams & Ward, 1998).

Im Folgenden werden die wenigen bisherigen Erkenntnisse über die Veränderungen der Skelettmuskulatur nach einem akuten Myokardinfarkt aufgeführt und ebenfalls kurz der Einfluss einer chronischer Herzinsuffizienz auf die Skelettmuskulatur angesprochen. Die Veränderungen des Titinproteins in der Skelettmuskulatur postischämisch sind dabei noch gänzlich unerforscht. Hieraus ergab sich unter anderem das Thema meiner Doktorarbeit, die Modifikation des Titins der Skelettmuskulatur 24h nach einem induzierten Myokardinfarkt.

1.2.2 Bisher bekannte pathologische Veränderungen der Skelettmuskulatur in Folge eines Myokardinfarktes

Die Beeinflussung der Skelettmuskulatur durch einen akuten Myokardinfarkt war bisher kein zentrales Thema von Forschungsprojekten. Die einzigen bisher bekannten Veränderungen der Skelettmuskulatur werden größtenteils auf den beim Myokardinfarkt erhöhten oxidativen Stress und auf freiwerdende Mediatoren, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen, zurückgeführt (Jordan, Zhao, & Vinten-Johansen, 1999). Studien haben dabei gezeigt, dass ein kurzzeitiger Einfluss von freien Radikalen auf den Skelettmuskel regenerative Prozesse anregt, wohingegen ein längeres und unkontrolliert erhöhtes oxidatives Stresslevel zu pathologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur führt. Welche Art von Veränderungen sich hierbei ergeben, konnte bisher nicht spezifiziert werden (Musaro, Fulle, & Fano, 2010). Des Weiteren führt ein erhöhtes oxidatives Stresslevel zu einer generellen endothelialen Dysfunktion. Dabei kommt es zu einer verminderten Möglichkeit der Vasodilatation der Gefäße aufgrund eines Stickstoffmonoxid (NO) -Defizits. In Ermangelung einer adäquaten Vasodilatation kann die Skelettmuskulatur im Falle einer Belastung nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden (Blum, 2018, p. 718).

Eine weitere Studie von Williams et al. (1998) befasst sich mit den langfristigen Folgen eines akuten Myokardinfarktes auf den Skelettmuskel. Hierzu wurde der Musculus gastrocnemius von Ratten 6 und 12 Wochen nach Induktion eines Myokardinfarktes entnommen und untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl die Calcium (Ca^{2+}) -Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) der Skelettmuskulatur als auch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR heraus deutlich erhöht sind. Die Versuchstiere, die 12 Wochen postischämisch untersucht wurden, zeigten außerdem eine signifikante Verringerung sowohl der Kraftentwicklung des untersuchten Muskels als auch eine Verringerung der An- und Entspannungsrate (Williams & Ward, 1998).

Deutlich häufiger untersucht als der Einfluss eines akuten Myokardinfarktes auf die Skelettmuskulatur wurde bisher der Einfluss einer chronischen Herzinsuffizienz auf den Skelettmuskel. In den Studien wurden insbesondere die der Herzinsuffizienz folgende Muskelschwäche und Muskelatrophie untersucht. Überraschenderweise konnte dabei festgestellt werden, dass nicht die verminderte hämodynamische Funktion des Herzens (Herzzeitvolumen oder linksventrikuläre Ejektionsfraktion) und die daraus resultierende erniedrigte periphere Durchblutung den Grund für die atrophische Skelettmuskulatur darstellt, sondern vielmehr verschiedene Veränderungen am Muskel selber (Volterrani et al., 1994). Es besteht die Möglichkeit, dass diese Veränderung bereits postischämisch auftreten und es bereits im Falle eines akuten Myokardinfarktes zur Schwächung der Skelettmuskulatur kommt.

1.3 Diabetes mellitus Typ 2

1.3.1 Pathophysiologie und Einteilung des Diabetes mellitus

Es gibt zwei Hauptgruppen des Diabetes mellitus. Zum einen den Diabetes mellitus Typ 1, der in jungen Jahren auftritt. Beim Diabetes mellitus Typ 1 kommt es zu einer autoimmunen Zerstörung der Beta (β)-Zellen im Pankreas und zu einem absoluten Insulinmangel. Zum anderen gibt es den Diabetes mellitus Typ 2 dessen Prävalenz mit zunehmendem Alter steigt und sich meist auf Grundlage eines metabolischen Syndroms entwickelt (Stammbe-tonte Adipositas, Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Glucosetoleranzstörung). In der vorliegenden Studie wird die Stoffwechsellage im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 betrachtet, weswegen im Folgenden genauer auf die Pathophysiologie dieses Diabetes mellitus Typs eingegangen wird. Die Entstehung der Erkrankung beruht maßgeblich auf drei Faktoren. Zunächst kommt es zu einer gestörten postprandialen Sekretion des Insulins, bei gleichzeitig durchgängig erhöhtem Glucagonspiegel führt dies auf Dauer zu einer hyperglykämischen Stoffwechsellage. Nach und nach werden die β -Zellen des Pankreas zudem apoptotisch. Ab einem Verlust von über der Hälfte der Zellen reicht die Insulinmenge nicht mehr aus, um den Blutzuckerspiegel angemessen zu regulieren. Des Weiteren bilden die peripheren Zellen eine Insulinresistenz aus. Dies kommt zum einen durch Down-Regulation und Schädigung der Insulin-Rezeptoren und zum anderen durch eine Störung der intrazellulären Signaltransduktion des Insulinrezeptors zustande (Herold, 2019). Klassischerweise ist zum Erkrankungsbeginn des Diabetes mellitus Typ 2 der Insulinspiegel erhöht. Der Körper versucht, der Resistenz der peripheren Insulinrezeptoren entgegen zu wirken und steigert seine Produktion solange, bis die erhöhte Insulinproduktion auf Grund der steigenden apoptotischen β -Zellen nicht mehr aufrecht gehalten werden kann (Hien, 2005).

1.3.2 Überblick über die Effekte von Insulin auf den Stoffwechsel

Insulin wird von den β -Zellen des Pankreas produziert und sezerniert. Sein Einfluss ist vielseitig weshalb ein gestörter Insulinstoffwechsel zu diversen Krankheitsbildern führen kann.

Die im folgenden dargestellte Abbildung 5 soll einen Überblick über die Effekte von Insulin auf den Stoffwechsel geben.

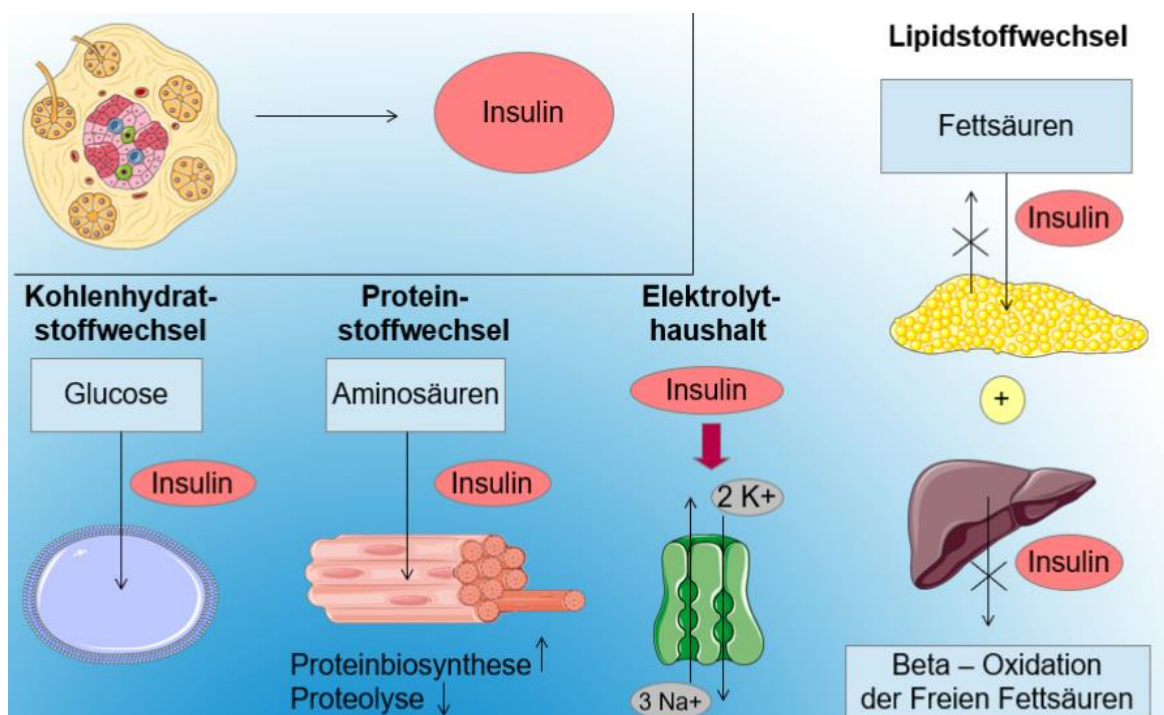


Abb. 5 Überblick über die Effekte von Insulin auf den Stoffwechsel. Insulin fördert die Glucoseaufnahme innerhalb des Kohlenhydratstoffwechsels. Es steigert die Aminosäureaufnahme in die Skelettmuskulatur und fördert dabei die Proteinbiosynthese und hemmt die Proteolyse. Im Lipidstoffwechsel steigert es die Aufnahme von Fettsäuren und hemmt deren Freisetzung. Ebenso hemmt es die Beta-Oxidation der freien Fettsäuren in der Leber. Auch an Membranen hat Insulin wichtige Angriffspunkte. Der unter anderem wichtigste stellt dabei die Natriumkaliumpumpe dar. Insulin fördert damit den Transport des Kaliums nach intra- und des Natriums nach extrazellulär.

Grundsätzlich wirkt Insulin in der Peripherie anabol, das heißt, es steigert das Anlegen von Energiespeichern. Im Kohlenhydratstoffwechsel fördert Insulin die Aufnahme von Glucose aus dem Blut in die Zellen. Es kann eine schnelle Wirkung des Insulins, welche auf der Steigerung von Enzymaktivitäten beruht, von einer langsamen Wirkung des Hormons unterschieden werden, die unter anderem auf dem Anheben der Transkription von Transportern besteht. An der Skelettmuskulatur steigert Insulin die Glucoseaufnahme durch den Einbau von GLUT4-Transportern in die Membran. Dabei induziert Insulin einerseits eine Verschmelzung von Vesikeln, die den GLUT4-Transporter enthalten, mit der Membran und andererseits induziert es eine gesteigerte Transkription des GLUT4-Transporters. Dieselbe Wirkung entfaltet Insulin an den Fettzellen. Bei unkontrollierter Insulinproduktion kann es folglich zu Hypoglykämien kommen, bei verminderter bzw. fehlender Insulinproduktion zu Hyperglykämien.

In der Leber und dem Skelettmuskel führt Insulin weiterhin zu einer Elimination von Glucose. Dies geschieht dadurch, dass das Hormon die Umwandlung von Glucose in seine Speicherform Glykogen fördert und den Abbau von Glykogen hemmt. Und dass es zum

anderen die Glykolyse, also den Abbau von Glucose, steigert. Auch auf den Lipidstoffwechsel hat Insulin einen Einfluss. Es steigert die Aufnahme von Fettsäuren und hemmt deren Freisetzung. Des Weiteren wird die Lipogenese in Leber und Fettgewebe durch Insulin induziert, wohingegen der Fettsäureabbau im Fettgewebe und die Beta-Oxidation der freien Fettsäuren in der Leber gehemmt werden. Der Einfluss von Insulin auf den Elektrolythaushalt der Zellen ist maßgeblich über die Na⁺/K⁺-Pumpe reguliert. An den Membranen der Leber und der Skelettmuskulatur aktiviert Insulin die Na⁺/K⁺-Pumpe, wodurch es zu einer Verlagerung des Kaliums nach intrazellulär und des Natriums nach extrazellulär kommt. Zuletzt ist die indirekte Stimulation der Proteinbiosynthese der Skelettmuskulatur durch Insulin zu nennen. Diese wird dadurch angekurbelt, dass Insulin die Aufnahme von Aminosäuren steigert. Es kommt auch hier zum vermehrten Einbau von Transportern und zu einem verminderten proteolytischen Abbau der Transporter durch Ubiquitinierung (Behrends et al., 2017, pp. 402-404).

Da Insulin auf viele Stoffwechselfvorgänge einen Einfluss hat, ist die Konsequenz bei nicht behandeltem Diabetes mellitus weitreichend. Es kommt zu Hyperglykämien, da die GLUT4-Transporter nicht mehr adäquat Glucose aus dem Blut transportieren können. Bei Typ 1 Diabetikern kommt es zudem nicht selten zu einer metabolischen Azidose, da bei der kompensatorisch gesteigerter Lipolyse zur Energiegewinnung vermehrt freie Fettsäuren anfallen, die zu Acetyl-CoA abgebaut und weiter zu Ketonkörpern umgewandelt werden. Bei Typ 2 Diabetikern ist meist eine Restfunktion des Insulins nachzuweisen, welche die vermehrte Lipolyse größtenteils verhindern kann. Weitere Effekte des Diabetes sind ein starker Kaliumverlust aufgrund der eingeschränkten Stimulation der Na⁺/K⁺-ATPase und eine verstärkte Proteolyse, was wiederum zur Abnahme der Muskelmasse der Patienten führt (Behrends et al., 2017, p. 407/408)

1.3.3 Diabetes mellitus Typ 2 und sein Einfluss auf das Geschehen eines akuten Myokardinfarkts

Die systemische Auswirkung eines Diabetes mellitus ist weitreichend und fördert die Entstehung eines akuten Myokardinfarkts und erschwert die Regeneration des Myokards nach einer Ischämie. Durch die diabetische Stoffwechsellage werden viele pathogene Mechanismen ins Rollen gebracht, die zur Schädigung der Endothelzellen führen. Diese pathogenen Mechanismen bestehen vor allen Dingen aus der Aktivierung von Signalkaskaden, die die Gefäßpermeabilität steigern, der Ansammlung von Abbauprodukten, sowie der Glykierung von Proteinen, die wiederum die Gefäße beschädigen. Auch die Gewebeschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies auf Grund von gesteigertem oxidativen Stress spielt eine wesentliche Rolle. Insgesamt haben Patienten mit einem Diabetes Typ 2 ein stark erhöhtes Risiko an sowohl Mikro- als auch Makroangiopathien zu erkranken. Die Mikroangiopathien betreffen dabei die kleineren Blutgefäße, klassische Beispiele sind dabei die diabetische Nephro- und Retinopathie. Die Makroangiopathien betreffen wiederum die mittelgroßen bis großen Blutgefäße und führen hauptsächlich zu Arteriosklerose (Gartner & Eigentler, 2008). Das Ausmaß der Arteriosklerose bestimmt maßgeblich die Prognose der Patienten. In bis zu 80% ist die Arteriosklerose ursächlich für einen tödlichen Ausgang eines Diabetes mellitus, da sie das Risiko einer koronaren Herzkrankung, eines akuten Myokardinfarkts sowie eines Schlaganfalls erhöht (Behrends et al., 2017).

Hinzu kommt, dass bei einem Patienten mit vorbestehender diabetischer Stoffwechsellage die Überlebenschancen im Falle eines Myokardinfarktes verringert ist (Paulson, 1997). Im Falle eines Überlebens, kommt es außerdem zu schwerwiegenderen Folgen als bei Patienten ohne einen Diabetes mellitus. Die erhöhte Komplikationsrate reicht dabei von häufiger auftretenden Herzrhythmusstörungen bis hin zu einer höheren Rate an resultierenden Herzinsuffizienzen (Echouffo-Tcheugui et al., 2018; Stone et al., 1989). Gründe hierfür könnte der bereits oben aufgeführte erhöhte oxidative Stress sein oder das verstärkte Auftreten von Arteriosklerose in allen Koronargefäßen, welches die ausreichende Durchblutung des Herzens nochmals erschwert (Ansley & Wang, 2013; Behrends et al., 2017).

Des Weiteren, und besonders wichtig auch für die Skelettmuskulatur, ist die Tatsache, dass es zur Steigerung der Glykogenolyse und der Aufnahme von Glucose über den GLUT-4 Transporter bei Myokardischämie kommt. Da im Falle eines Diabetes mellitus jedoch ein Insulinmangel vorliegt, und es deshalb nicht zu einer Steigerung der Glucoseaufnahme kommen kann, muss auf die Verwertung von freien Fettsäuren zurückgegriffen werden. Dieser Vorgang verbraucht wiederum mehr Sauerstoff. Im Herzen reduziert dies die postischämisch sowieso schon eingeschränkte Myokardfunktion (Behrends et al., 2017; Zarich & Nesto, 2007). Zusätzlich kommt es auch im nicht-ischämischen Myokard (Remote-Bereich) postischämisch zu stärkeren Veränderungen wie einer verminderten Kontraktilität und einer herabgesetzten Ejektionsfraktion unter diabetischer Stoffwechsellage (Aronson, Rayfield, & Chesebro, 1997; Iwasaka et al., 1992). Da auch der nicht-ischämische, also nur indirekt betroffene, Bereich nach akutem Myokardinfarkt im Falle eines Diabetes mellitus stärker beeinträchtigt ist, könnte dies auch auf die peripherer gelegene Skelettmuskulatur zutreffen. Auch hier kann der gesteigerte Bedarf an Glucose durch den Mangel an Insulin nicht gedeckt werden und möglicherweise kann es auch im Skelettmuskel zu einer verminderten Kontraktilität kommen. Veränderungen im Skelettmuskel wurden diesbezüglich jedoch bisher noch nicht genauer untersucht. Die vorliegende Studie geht jedoch näher auf die Modifikationen der Skelettmuskulatur unter diabetischer Stoffwechsellage und postischämisch ein.

1.4 Titin

1.4.1 Aufbau und molekulare Struktur

Titin, auch „Calprotectin“ genannt, ist das größte Protein des menschlichen Körpers. Es kommt sowohl in der Herz- als auch in der Skelettmuskulatur vor und übernimmt eine entscheidende Rolle sowohl als Gerüstprotein als auch in der Funktion als molekulare Feder welche maßgeblich die passiven Eigenschaften eines Sarkomers bestimmt (Kötter, Andresen, & Kruger, 2014).

Der A-Banden-Anteil des Titins stellt mit 2 Megadalton (MDa) den größten Anteil des Proteins dar (Bang et al., 2001). In der A-Bande ist Titin eng mit Myosin und dem Myosinbindenden-Protein C assoziiert und setzt sich zusammen aus sich wiederholenden *Immunoglobuline-like-* (Ig-) und Fibronektin-Domänen (Bang et al., 2001; Krüger & Linke, 2011; Lange et al., 2006). Es stabilisiert das Myosinfilament vor allem beim Kontraktionsvorgang und garantiert dadurch eine optimale aktive Kraftentwicklung (Gautel, 2011; Granzier & Wang, 1993a). Dies erfolgt unter anderem durch eine Verankerung des Myosinfilaments im Zentrum des Sarkomers. Das Zentrum des Sarkomers bildet der M-Streifen, an dem Titin mit seinem COOH-Ende befestigt ist (Lange et al., 2006). Innerhalb der M-Bande kommt es zu einer Überlappung mit dem gegenüberliegenden Titinprotein. Der distale M-Bandenbereich von Titin enthält außerdem eine Serin/Threonin-Kinasen Domäne (Chauveau, Rowell, & Ferreira, 2014). Neben der Funktion als Gerüstprotein in der A-Bande ist Titin auf Grund seines I-Bandenanteils zusätzlich für die passiven Eigenschaften, wie die spezifische passive Spannung, des Myofilaments verantwortlich. Der I-Banden-Anteil stellt den elastischen Teil des Titinproteins dar (Bartoo, Linke, & Pollack, 1997). Titin ist in diesem Bereich wie eine frei verlaufende Sprungfeder angeordnet und übernimmt die Funktion einer molekularen Feder, welche eine wesentliche Rolle während der Sarkomerdehnung spielt. In diesem Bereich kann Titin reversibel bei Dehnung verlängert werden, wodurch die spezifische passive Spannung des Myofilaments aufgebaut wird (Bartoo et al., 1997; Granzier & Wang, 1993b). Die passive Spannung ist anschließend für das Zurückführen des Filaments in seine Ausgangsposition nach Kontraktion verantwortlich (Chauveau et al., 2014; Krüger & Linke, 2011). In der I-Band stellt Titin die Verbindung des Myosinfilaments zur Z-Scheibe her, an der es mit seinem NH₂-Ende befestigt ist (Lange et al., 2006; Witt et al., 2006). Dieser Abschnitt des skelettalen Titins besteht aus den proximalen Ig-Domänen, der N2A-Domäne, inkl. N2-A *unique* Sequenz (us), der PEVK-Region und den distalen Ig-Domänen. Die für die Elastizität wichtige PEVK-Region wurde benannt nach dem hohen Anteil an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Valin (V) und Lysin (K) (Linke et al., 1996; Linke et al., 1999; Trombitas, Greaser, French, & Granzier, 1998). Eine schematische Darstellung des Titins der Skelettmuskulatur ist in Abbildung 6 dargestellt inklusive der Phosphorylierungspunkte innerhalb der PEVK-Region für die *Ca*²⁺/*calmodulin-dependent protein kinase II delta* (CaMKII δ) und die *Ca*²⁺-*dependent protein kinase C α* (PKC α), welche die Steifigkeit des Titinproteins modulieren und auf die im nächsten Abschnitt der Einleitung näher eingegangen wird.

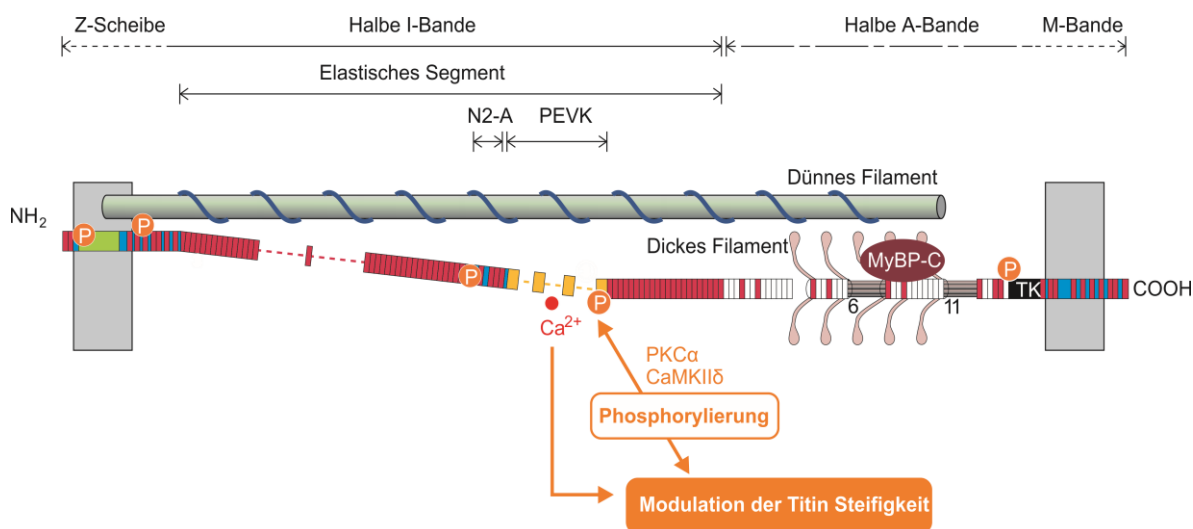


Abb. 6 Schematischer Aufbau des skelettalen Titinproteins (Modifiziert nach (Krüger & Kötter, 2016)) Die Abbildung zeigt schematisch den strukturellen Aufbau des Titinproteins der Skelettmuskulatur. Innerhalb des I-Banden-Bereichs, dem elastischen Bereich des Titinproteins, befinden sich die proximalen und distalen Ig-Domänen, die N2-A-Region sowie die PEVK-Region. Mit seinem NH₂-Ende ist das Protein an der Z-Scheibe verankert. Die Abbildung zeigt zudem die Phosphorylierungspunkte für die CaMKII δ und die PKC α innerhalb der PEVK-Region, welche die Steifigkeit des Titinproteins modulieren. Im A-Banden-Anteil ist Titin eng mit Myosin und dem Myosin-bindenden-Protein C assoziiert. Mit seinem COOH-Ende ist es an der M-Bande befestigt. In diesem Bereich befindet sich des Weiteren eine Serin/Threonin-Kinasen Domäne. Das dicke Filament bezeichnet das Myosinfilament, das dünne Filament das Aktinfilament.

1.4.2 Mögliche Modifikationen von Titin auf molekularer Ebene und die daraus resultierende Veränderung der passiven Spannung

Die passive Spannung eines Sarkomers wird hauptsächlich durch die Steifigkeit des Titinproteins bestimmt. Je steifer das Protein, desto schwieriger ist eine Dehnung und desto höher ist die entstehende Spannung bei Dehnung des Muskels. Die bestehenden Unterschiede in der Steifigkeit des Titins der Herz- und Skelettmuskulatur sind unter anderem auf das Vorkommen verschiedener Isoformen und ihrer Längenvarianzen zurückzuführen. Im Herzmuskel kommt die kleinere und steifere N2B Isoform mit 3,0 MDa sowie die größere und elastischere N2BA-Isoform mit über 3,2 MDa vor. Im Skelettmuskel existiert hingegen ausschließlich die N2A-Isoform mit 3,3-3,7 MDa. Sie existiert in verschiedenen muskelspezifischen Längen-Varianten, die durch alternatives Spleißen des Titingens entstehen (Freiburg et al., 2000; Krüger & Linke, 2011; Neagoe, Opitz, Makarenko, & Linke, 2003; Prado et al., 2005). Aus der Studie von Granzier und Irving aus dem Jahre 1995 geht hervor, dass die passive Spannung der Herzmuskulatur bei passiver Dehnung deutlich stärker ansteigt als die der Skelettmuskulatur. Dieser Umstand beruht darauf, dass sich die Isoformen vor allen Dingen in der Zusammensetzung und Länge des elastischen I-Banden-Anteils des Titinproteins unterscheiden (Kötter et al., 2013; Prado et al., 2005). Die N2A-Isoform der Skelettmuskulatur mit 3,2-3,7 MDa besitzt demnach einen längeren elastischen I-Banden-Anteil als beispielsweise die kardiale N2B-Isoform mit nur 3,0 MDa. Dadurch wird

bei Dehnung der N2A-Isoform später Spannung aufgebaut (Granzier & Irving, 1995; Prado et al., 2005). Die elastischen Eigenschaften des I-Banden-Anteils sind auf die besondere Proteinfaltung in diesem Bereich zurückzuführen. In den Ig-Domänen ist Titin in der sogenannten beta-Faltblattstruktur angeordnet, die nur mit hohem Kraftaufwand gedehnt werden kann (Politou, Thomas, & Pastore, 1995). Im Gegensatz dazu, liegt im restlichen I-Banden-Anteil des Titinproteins (PEVK und N2B/A-Region) eine Sekundärstruktur vor die als sogenannte „*random coils*“ bezeichnet wird (Lee, Hsin, Mayans, & Schulten, 2007). Diese „*random coils*“ stellen eine Art Knäuel dar. Sie können bei Dehnung reversibel entfaltet werden (Lee et al., 2007). Außerdem kann diese Art der Sekundärstruktur durch posttranslationale Modifikationen am Protein verändert werden. Posttranslationale Modifikationen führen dabei zu Umlagerung von Bindungen, und damit zu einer Strukturveränderung (Conibear, Rosengren, Becker, & Kaehlig, 2019; Hendus-Altenburger et al., 2019). Diese Veränderung resultiert wiederum in einer Veränderung der Persistenzlänge von Titin, und damit auch in einer veränderten Steifigkeit (Hidalgo et al., 2009).

Ansatzpunkt für posttranslationale Modifikationen des Proteins, welche Einfluss auf die passive Spannung haben, stellt die Phosphorylierung des Titins an bestimmten Positionen dar. Im Herzen sind dabei vor allen Dingen die N2B-Region und die PEVK-Region betroffen. Im Skelettmuskel untersucht die vorliegende Studie die PEVK-Region auf eine Modifikation in Form eines veränderten Phosphorylierungslevels. Im Herzen kommt es in der N2B-Region zur Phosphorylierung durch die CaMKII δ (Hidalgo & Granzier, 2013), die *extracellular signal regulated kinase 1/2* (Erk1/2) (Hidalgo & Granzier, 2013; Raskin et al., 2012) sowie die *cGMP*- und *cAMP*-*dependent protein kinase* (PKG/PKA) (Hidalgo & Granzier, 2013; Krüger & Linke, 2009). Die Phosphorylierung in dieser Region führt zu einem Anstieg der Persistenzlänge von Titin, und damit zu einer Abnahme der passiven Spannung (Hamdani, Krysiak, et al., 2013; Krüger et al., 2009). Die genaue Ursache für diesen Umstand ist noch ungeklärt. Eine mögliche Erklärung wird jedoch bereits in der Studie von Kötter et al. aus dem Jahre 2014 diskutiert. Die Überlegung besteht darin, dass der bereits negativ geladenen N2B-Region ein ebenfalls negativ geladenes Phosphat hinzugefügt wird. Dieser Umstand könnte zu einer Umwandlung der Region in eine positiv-geladene Sequenz, wie der PEVK-Region, führen. Die dadurch möglicherweise entstehenden intramolekularen elektrischen Interaktionen könnten die Verlängerung der Persistenzlänge dieser Domäne erklären (Kötter et al., 2014). Anders sieht es im Hinblick auf die PEVK-Region aus, die eine bereits positiv geladene Region darstellt. Hier ist bisher die PKC α bezüglich der Phosphorylierung am Herzmuskel untersucht worden und es konnte gezeigt werden, dass es unter einem erhöhten Phosphorylierungsstatus zu einer verminderten Persistenzlänge des Titinanteils der I-Bande kommt, und dadurch zu einer Erhöhung der passiven Spannung (Hidalgo & Granzier, 2013; Hidalgo et al., 2009). Die Frage, ob die PKC α auch im Skelettmuskel für die Phosphorylierung der PEVK-Region verantwortlich ist und ob es auch hier bei gesteigertem Phosphorylierungslevel zu einer erhöhten passiven Spannung kommt, ist unter anderem Thema dieser Dissertation.

1.4.3 Bereits erforschte Modifikationen des Titinproteins in Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt und unter diabetischer Stoffwechsellage

Bisher gibt es wenige Studien bezüglich Titin und seiner Beeinflussung durch verschiedene Stoffwechsellagen oder Erkrankungen, wie zum Beispiel den Diabetes mellitus oder den

akuten Myokardinfarkt. Die bisherigen Studien beschäftigen sich zudem mit den Veränderungen des kardialen Titins und nicht mit den Veränderungen des Titins der Skelettmuskulatur. Die vorliegenden Studienergebnisse basieren ausschließlich auf Versuchen mit Titin der Skelettmuskulatur, da der Aufbau des Titinproteins in Kardiomyozyten jedoch in vielen Punkten dem Titin der Skelettmuskulatur ähnelt und um die Modifikationen der kardialen und skelettalen Titinisoformen später gegenüberstellen zu können, wird im Folgenden auf die bereits erforschten Modifikationen des kardialen Titins eingegangen.

Unter diabetischer Stoffwechsellage kommt es zu mehreren, gleichzeitig ablaufenden strukturellen Veränderungen am Herzen. Zum einen erhöht sich die passive Steifigkeit des linken Ventrikels während der Diastole. Zum anderen kommt es zur Hypertrophie und Fibrosierung der Herzmuskulatur. Dabei wird insgesamt die Kammerdehnbarkeit vermindert (Falcao-Pires et al., 2011; Hamdani, Franssen, et al., 2013; Hamdani et al., 2014; Hopf et al., 2018). In der Studie von Hopf et al. aus dem Jahre 2018 wurde nachgewiesen, dass es in humanen Kardiomyozyten von Diabetikern zu einem vermehrten Auftreten der elastischeren N2BA-Titinisoform kommt. Dennoch zeigte sich in der Studie eine gesteigerte Titin-abhängige passive Spannung der Kardiomyozyten. Daraufhin stellte sich die Frage wie es, trotz einem Isoformenwechsel hin zur elastischeren N2BA-Isoform, zu der nachgewiesenen Steigerung der Titin-abhängigen Spannung kommen kann. Im Folgenden wurde die Veränderung des Phosphorylierungslevels des Titinproteins unter diabetischer Stoffwechsellage genauer untersucht (Hopf et al., 2018). Bereits 2014 zeigten Studien, dass es unter diabetischer Stoffwechsellage zu einem erniedrigten Phosphorylierungslevel der N2B-Region des Titinproteins kommt und dies eine erhöhte passive Spannung zur Folge hat (Hamdani et al., 2014). Die erhöhte passive Spannung konnte in nachfolgenden Studien unter anderem auf eine verminderte Phosphorylierung der Position S4099 durch die PKG und der Position S4010 durch die Erk 1/2 in der elastischen N2-B-Region der Versuchstiere zurückgeführt werden. Die herabgesetzte PKG Aktivität konnte dabei auf eine geringerer cGMP-Konzentration bei Insulinmangel und gestörtem Insulin Signalweg zurückgeführt werden wohingegen die Aktivität der ERK1/2 direkt von dem gestörten Signalweg sowie dem Insulinmangel betroffen ist (Hopf et al., 2018). Eine wichtige Rolle spielt außerdem die in diabetischen Herzen erhöhte PKC α -Aktivität. Durch die gesteigerte Aktivität der PKC α kommt es zu einer Hyperphosphorylierung der PEVK-Region an Position S11878 und S12022, was ebenfalls eine Erhöhung der passiven Steifigkeit mit sich bringt. Vermutete Ursache für die gesteigerte Aktivität der PKC α ist das anfänglich erhöhte Insulin-Level beim Typ 2 Diabetes mellitus welches vermutlich zu einer chronischen Aktivitätssteigerung der Kinase führt die auch bei anschließendem Insulinmangel weiterhin anhält (Hopf et al., 2018). Weiterhin konnte eine gesteigerte PKC α Signaltransduktion auf die erhöhter Diacylglycerol-Synthese bei dauerhaft erhöhtem Blutzuckerlevel zurückgeführt werden (Gerald & King, 2010).

Auch nach einem akuten Myokardinfarkt kommt es nachweislich zu Veränderungen des Titinproteins und einem starken und schnellen Anstieg der passiven Spannung der Kardiomyozyten. Die erhöhte passive Spannung wird dabei ebenfalls durch eine Hyperphosphorylierung der PEVK-Region (S11878 & S12022) durch die PKC α hervorgerufen. Die erhöhte Aktivität der PKC α wird dabei durch das im Zuge des Remodeling-Prozesses nach akutem Myokardinfarkt freiwerdende Interleukin 6 (IL6) gesteigert. Eine in Studien durchgeführte Hemmung des IL-6- Signalwegs unmittelbar vor dem Infarktgeschehen zeigte ein Ausbleiben der Infarkt induzierten Erhöhung der passiven Spannung und war mit einer Verschlechterung der kardialen Funktion einige Wochen nach Infarkt assoziiert. Diese Erkenntnis legt

die Vermutung nahe, dass die Erhöhung der Titin-abhängigen Steifigkeit in den Kardiomyozyten ein wichtiger Kompensationsmechanismus nach Myokardinfarkt ist, mit dem Ziel, die Funktion des überlebenden Herzgewebes postischämisch zu erhalten (Kötter et al., 2016).

Eine weitere Modifikationsmöglichkeit zur Erhöhung der passiven Spannung des Herzmuskels ergibt sich, wie auch beim Diabetes, durch eine verminderte Phosphorylierung der N2B-Region aufgrund der verminderten Aktivität der Erk1/2 (Position S4010) und der PKG (Position S4099) (Kötter et al., 2016). Zur weiteren Diskussion als relevante Kinase im Falle des Myokardinfarktes stand außerdem noch die Aktivität der CaMKII δ . Eine gesteigerte Aktivität der CaMKII δ im Falle eines akuten Myokardinfarktes wurde in Studien bereits 2007 nachgewiesen. (Vila-Petroff et al., 2007). Die dadurch bedingte Phosphorylierung führt nach bisherigen Erkenntnissen jedoch eher zu einer Verringerung der passiven Spannung der Kardiomyozyten und nicht zu einer Steigerung (Hamdani, Krysiak, et al., 2013).

Da es sowohl nach akutem Myokardinfarkt als auch im Falle eines Typ-2-Diabetes zu einem gesteigerten oxidativen Stresslevel bzw. zu einem vermehrten Auftreten freier Sauerstoffradikale kommt, welche Einfluss auf die Titin-abhängige Steifigkeit der Kardiomyozyten haben, werden diese Modifikationen ebenfalls kurz erläutert (Frangogiannis, 2014; Rehman & Akash, 2017). Oxidativer Stress hat verschiedene Auswirkungen auf die passive Spannung. Es führt im kardialen Titin innerhalb der N2B-Region zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, wodurch das Titin einen Teil seiner Elastizität einbüßt und es zu einer Erhöhung der passiven Spannung kommt (Grutzner et al., 2009). Anders verhält es sich mit der S-Gluthathionylierung innerhalb der Ig-Domäne des Titinproteins. Es konnte festgestellt werden, dass es bei erhöhtem oxidativem Stresslevel zum Freilegen von kryptischem Cystein innerhalb der Ig-Domäne des Titinproteins kommt, welches im Folgenden S-gluthathionyliert wird. Dies verhindert wiederum zeitweise die Rückverlagerung der Ig-Domänen in ihre ursprüngliche beta-Faltblatt-Struktur, und führt damit zu einer erhöhten Instabilität des Proteins. Diese Modifikation führt wiederum zu einer Verminderung der passiven Spannung (Alegre-Cebollada et al., 2014). Des Weiteren kann es in Folge von erhöhtem oxidativem Stress zu einer S-Nitrosylierung des Titinproteins kommen mit bisher noch unklarem Einfluss auf die passive Spannung (Figueiredo-Freitas et al., 2015). Eine weitere Veränderung unter dem Einfluss freier Radikaler stellt schlussendlich die Arginylierung von Titin dar. Unter oxidativem Stress kann es zu einem Funktionsverlust der Arginyltransferase (ATE1) und somit zu einer fehlenden Arginylierung des Proteins kommen. Titin kann normalerweise an fünf Stellen der A-Banden-Region arginyliert werden. Es wird vermutet, dass die Arginylierung wichtig für eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Titinprotein und dem Myosinfilament ist. Diese Interaktion hat wiederum Einfluss auf die passive Spannung und aktive Krafterwicklung eines Sarkomers. Es konnte festgestellt werden, dass es bei Mäusen mit Funktionsverlust der Arginyltransferase (ATE1) zu einer verminderten passiven Spannung sowie aktiven Krafterwicklung kommt (Leite et al., 2016). Auch sind Modifikationen verschiedener für das kardiale Titin relevanter Kinasen, wie der PKG, unter oxidativen Stress bekannt (Boerrigter et al., 2007). Ob diese Modifikationen auch die relevanten Kinasen des skelettalen Titins beeinflussen, ist dabei noch unbekannt.

Den Anlass für die vorliegende Studie ergaben schlussendlich Studienergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Kötter et al., 2016; Unpublished, 2019). Diese Studien beschäftigten sich mit dem Remote-Areal des Herzens. Sie zeigen im Falle eines Typ-2-Diabetes und nach

einem akuten Myokardinfarkt einen signifikanten Anstieg des Phosphorylierungslevels an der Position Ser12022 und teilweise auch an Position Ser11878 des Titinproteins sowie eine damit einhergehende erhöhte passive Spannung (Kötter et al., 2016; Unpublished, 2019). Das Remote-Areal stellt das nicht-ischämische Gewebe des Herzens dar welches das ischämische Myokard umgibt. Der Umstand, dass auch das kardiale Titin des nicht direkt von der Ischämie betroffenen Gewebes modifiziert wird, warf die Frage auf, ob es sich um eine systemische Veränderung handeln könnte, welche auch das Titin der peripheren Skelettmuskulatur betrifft. Daraufhin wurde in der vorliegenden Studie das Titin der Psoasmuskulatur von diabetischen Mäusen mit und ohne I/R untersucht. Es wurde das Phosphorylierungslevel an den Serinresten Ser11878 und Ser12022 erhoben und die passive Spannung der Skelettmuskelfasern der einzelnen Versuchsgruppen untersucht und miteinander verglichen.

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie ist es herauszufinden inwiefern sich ein Typ-2 Diabetes und ein akuter Myokardinfarkt in Form von posttranslationalen Modifikationen auf das Skelettmuskelprotein Titin und seine mechanische Funktion auswirken.

Die entnommenen Psoasmuskulatur-Proben, von männlichen, 12 bis 14 Wochen alten Mäusen mit genetischem C57BLKS/J Hintergrund, werden im Folgenden zunächst im Hinblick auf einen veränderten Kompensationsmechanismus unter diabetischer (db/db) im Vergleich zu nicht-diabetischer (db/+) Stoffwechsellage untersucht. Dabei werden die db/db Proben mit den db/+ Proben bei zusätzlich induzierter 60-minütiger Ischämie und anschließender 24-stündiger Reperusionszeit (I/R) verglichen. Genauer wird der Phosphorylierungsstatus der elastischen Titin PEVK-Region an den Serinresten Ser11878 sowie Ser12022 erhoben.

Weiterführend wird die passive Spannung der Skelettmuskelfasern der Versuchsgruppen erhoben und in Vergleich gesetzt. Anschließend muss der Zusammenhang zwischen modifiziertem Phosphorylierungsstatus und passiver Spannung erörtert werden. Eine veränderte passive Spannung könnte ein erster Hinweis auf eine veränderte Funktionalität der Skelettmuskulatur sein.

Die Studie könnte nach Beantwortung der Frage, ob Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 nach akutem Myokardinfarkt dieselben Kompensationsmechanismen vorweisen können wie Menschen unter nicht-diabetischer Stoffwechsellage, längerfristig auch einen therapeutischen Ansatzpunkt liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborutensilien

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Bildschirm	Flatron E22 10T	LG
Binokular	S8AP0	Leica
Blotting	Trans Blot Turbo	Biorad
Blotting	Fastblot B44	Biometra
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophorese -Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Fasermessapparatur	Myoscope-Skinned	Myotronic Heidelberg
Feinwaage	Ae163	Mettler
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Infrared Imaging System	Oyssey	Licor
Kombischüttler	KL2	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	IKA RTC Classic	IKA
Microzentrifuge	mini CX73.1	Roth
Mikroskop	ID03	Zeiss
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Orbitalschüttler	Shaker DOS 10L	Neo Lab
PC	Paola FX	Chieftec
pH Meter	MP220	Mettler Toledo
Power Supplies	Power Pack P25	Biometra
Reagentenschüttler (Vortex)	444-1372	VWR
Taumel-Rollenmischer	RMS-30V	CAT
Thermomixer/Heizblock	Compact 5350	Eppendorf
Thermostate	Thermo C10	Haake
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore

Wasserbad	Julabo 20B	Julabo
Werkbank	Safe 220	Thermo scientific
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge	Rotofix 32	Heraeus

Tabelle 1 Laborutensilien

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer (pH 8.8)	300mM Tris / HCL 100 mM Tricine
Blockierungslösung	3% BSA in 1x TBST
Kathodenpuffer (pH 8.7)	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris / HCL
PBS - Phosphat buffered saline (pH 7.4)	150mM Natriumchlorid 2,5mM Kaliumchlorid 1,5mM Kaliumdihydrogenphosphat 3mM Natriumhydrogenphosphat
Phosphataseinhibitorcocktail (25x)	250 mM Natriumfluorid 5 mM Natriumorthovanadat 5 mM Natriumpyrophosphat Decahydrat 50 mM β -Glycerophosphat
PVDF stain	0,075 % Serva Blue in Methanol
PVDF destain	10 % Essigsäure 40 % Ethanol 50% Aqua bidest
Relaxation Lösung (pH 7.0)	10 mM Imidazole 3mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) 10 mM Adenosin 5`triphosphatdinatrium 3 mM Magnesiumchlorid 47.7 mM Kreatinphosphate 2 mM Dithiothreitol

	1 % (v/v) Proteaseinhibitorcocktail 4 % (v/v) Phosphataseinhibitorcocktail (25x)
SDS Laufpuffer 10 X	250mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1,92 M Glycin 1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
SDS Sammelgelpuffer pH 6.8	500mM Tris / HCL 0,4% (v/v) Natriumdodecylsulfat
SDS Titinprobenpuffer	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 3% (v/v) Natriumdodecylsulfat 0,035 Serva Blue 10% Glycerol
SDS Trenngelpuffer pH 8.8	1,5M Tris / HCL 0,4% (v/v) Natriumdodecylsulfat
Stripping Puffer	6M Guanidinhydrochlorid 20mM Tris 0,2% Nonident P40 0,1M β -Mercaptoethanol
10 x TBST pH 8.0	0,5 M Tris/ HCL 1,5 M Natriumchlorid 0,5% Tween - 20

Tabelle 2 Puffer und Lösungen

2.1.3 Reagenzien

Reagenzien	Firma
Aceton	Sigma Aldrich
Acrylamide/Bis (29:1)	Biorad
Adenosin 5' triphosphatdinatrium	Appli Chem
Agarose	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma Aldrich
APS	AppliChem
β -Glycerophosphat	Sigma Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich

BDM	Sigma Aldrich
Blotting Papier	Macherey Nagel
Bradford	Thermo Fisher
BSA	Capricorn Scientific
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL	7Bioscience
Essigsäure	Appli Chem
Ethanol	VWR
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich
Glycin	Roth
Harnstoff	Appli Chem
HCL	Merck
Imidazole	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Kreatinphosphat	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich
Methanol	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Natriumfluorid	Sigma Aldrich
Natriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich
Natriumpyrophosphat Decahydrat	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma Aldrich
Serva Blue	Serva Electrophoresis
TEMED	Appli Chem
Thioharnstoff	Sigma Aldrich
Tricine	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth
Triton-X-100	Appli Chem
Tween - 20	Sigma Aldrich

Tabelle 3 Reagenzien**2.1.4 Antikörper**

Name	Verdünnung	Firma	Erzeugt in
PKCα (phosphoT497)	1 : 10 000	Abcam	Kaninchen
PKCα (Y124)	1 : 10 000	Abcam	Kaninchen

PEVK-total	1 : 50 000	Eurogentec	Kaninchen
Phospho-PEVK S11878	1 : 1 000	Eurogentec	Kaninchen
Phospho-PEVK S12022	1 : 2 000	Eurogentec	Kaninchen

Tabelle 4 Antikörper

Primäre und Sekundäre Antikörper

Der Antikörper gegen die PKC α wurde von der Firma Abcam produziert. Bei allen anderen verwendeten Antikörpern handelt es sich um solche der Firma Eurogentec. Der Buchstaben-zahlencode bezieht sich auf humanes Titin (*UniProtKB: Q8WZ42*).

Zur Antikörpergewinnung wurden Kaninchen mithilfe bestimmter Aminosäuresequenzen immunisiert. Dabei wurden Antikörper gegen die PEVK-Region des Titinproteins und phosphospezifische Antikörper gegen die Sequenzen -Ser11878 (*CEVVLKpSVLRKR*) und -Ser12022 (*KLRPGpSGGEKP*) generiert und affinitätsgereinigt.

2.1.5 Maus Skelettmuskulatur Proben

Tierversuche

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzausschuss der zuständigen Behörde (Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) durchgeführt, der die experimentellen Protokolle überprüft und genehmigt hat (Az.84-02.04.2013.A122; Az.84-02.04.2017.A145).

Verwendete Tiermodelle

Bei den verwendeten Versuchsgruppen handelte es sich um eine heterozygote Kontrolltiergruppe, die in einem Allel eine Punktmutation ihres Leptin-Rezeptors aufwies (db/+ sham). Eine zweite Versuchsgruppe stellten die diabetischen Versuchstiere dar, bei denen eine homozygote Punktmutation im Leptin-Rezeptor induziert wurde (db/db sham). Beide Gruppen wurden nun der Voroperation zur Anlage einer Ligaturhilfe unterzogen (*siehe Unterpunkt 2.1.5 ‚Probengewinnung‘*). Anschließend wurde jedoch nur bei einem Anteil beider Gruppen eine 60-minütige Ischämie mit anschließender 24-stündiger Reperfusionzeit (I/R) induziert (db/+ I/R und db/db I/R).

Operative Ischämie-Induktion und Probengewinnung

Als Untersuchungsmaterial kam die Psoasmuskulatur von heterozygoten db/+ Mäusen (genetischer Hintergrund: C57BL/6) und db/db Mäusen (genetischem Hintergrund: C57BLKS/J) zum Einsatz. Bei den diabetischen Versuchstieren war die Ausbildung des Leptin-Rezeptors auf Grund einer homozygoten Punktmutation gestört.

Infolge dessen entwickelten die Versuchstiere im Verlauf eine Insulinresistenz, eine Hyperglykämie sowie Übergewicht. Ein Kriterium zur Verwendung der Proben war das genannte Übergewicht sowie eine Glukosekonzentration von mindestens 300mg/dl (Vergleichswert db/+ Versuchstiere: 150mg/dl). Das exakte Gleichsetzen der db/db Tiere mit dem menschlichen Typ 2 Diabetes mellitus Patienten ist dennoch nicht möglich. Auf Grund der oben genannten Kriterien können die Proben jedoch als gute Annäherung an den menschlichen Typ 2 Diabetiker verwendet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Titin-abhängige passive Spannung, welche auch in der vorliegenden Studie untersucht wird, unter diabetischer Stoffwechsellage sowohl in humanen Myokardproben als auch in Myokardproben von Mäusen durch ein verändertes Phosphorylierungslevel signifikant erhöht ist (Hopf et al., 2018).

In beiden Versuchsgruppen wurde bei den I/R Tieren mithilfe einer closed chest Ligation der *left anterior descending artery* (LAD) eine 60-minütige Ischämie hervorgerufen. Darauf folgend wurde das Herz 24 Stunden reperfundiert, bevor das Probenmaterial entnommen wurde. Bei den verwendeten Sham-Tieren wurde lediglich die Voroperation durchgeführt, ohne letztendlich eine Ischämie zu induzieren. Im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte die Entnahme der quergestreiften Psoasmuskulatur.

Ablauf der closed chest LAD: Alle Versuchstiere wurden einer Voroperation unterzogen, unter der ihnen die Ligaturhilfe eingelegt wurde. Dabei wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte platziert und erhielten zur Operationseinleitung Buprenorphin, Ketamin und Xylazin. Anschließend erfolgte die Intubation mithilfe einer 20G Venenverweilkanüle und die darauffolgende Beatmung mit einer Frequenz von 150 pro Minute sowie einem Atemzugvolumen von 250ml. Die verwendete Luft enthielt einen Sauerstoffgehalt von 40% und war zusätzlich mit 2-3% Isofluran angereichert. Nach Eröffnung des Brustkorbs zwischen der dritten und vierten Rippe wurde die LAD identifiziert und unter dieser ein Faden der Stärke 7/0 durchgezogen. Die Enden des Fadens wurden anschließend extrathorakal in einer subkutanen Tasche gelagert. Alle Öffnungen wurden darauffolgend mithilfe einer Naht steril verschlossen und die Versuchstiere wurden extubiert. Es folgte eine konstante Analgesierung über drei Tage mit Buprenorphin s.c. (0,1mg/kg Körpergewicht) alle 6-8h. Nach Ablauf der drei Tage erfolgte die Induktion einer Ischämie, bzw. Sham-Ischämie. Die Einleitung der Narkose erfolgte wiederum mithilfe von 2% Isofluran. Anschließend wurden die subkutanen Fäden freigelegt und die Fäden vorsichtig festgezogen, mit Ausnahme bei den Sham-Tieren. Die Fäden wurden soweit zugezogen, bis es zu einer, im EKG deutlich erkennbaren, ST-Strecken-Hebung und damit zu einem nachweislichen Myokardinfarkt kam. Nach 60-minütiger Ischämie, bei kontrollierter 37°C Körpertemperatur, wurde eine durch das EKG dokumentierte Reperfusionphase eingeleitet, indem die Fäden durchschnitten wurden. Durch steriles Verschließen der Haut mithilfe einer Naht und erneuter Analgesie mit Buprenorphin s.c (0,1mg/kg Körpergewicht) alle 6-8h wurde der Eingriff beendet.

24 Stunden postoperativ erfolgte die artgerechte Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation. Im Rahmen der Blut- und Organentnahme wurden für die vorliegende Arbeit der Muskelus psoas entnommen. Die Proben wurden zum Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Ein anderer Teil wurde in glycerinisierter Lösung bei -20°C eingefroren und zur Faserkraftmessung verwendet.

2.1.6 Biochemische Methoden

Probenaufbereitung von Skelettmuskulatur adulter Mäuse

Die Gewebeprobe wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Um Gewebeprobe zum beladen von Gelen zu erhalten, wurden Gewebeanteile von den Proben abgetrennt und diese auf Trockeneis mithilfe eines Skalpell mechanisch zerkleinert. Das Gewebestück wurde anschließend durch Zugabe von Titinprobenpuffer solubilisiert. Die Menge war abhängig von der Größe des Gewebestücks und lag zwischen $60\mu\text{l}$ und $120\mu\text{l}$. Die solubilisierten Gewebeprobe wurden in ein Reagenzglas überführt und auf Eis gestellt.

Zum Ende meiner Versuchsreihe wurde die Proteinkonzentration innerhalb des solubilisierten Probenmaterials mithilfe der Bradford-Methode photometrisch bestimmt. Dazu erfolgte zunächst die Herstellung einer Lösung durch Verwendung der unten aufgelisteten Reagenzien (Tab. 5). Anschließend wurde mithilfe eines Spektrophotometers die Absorption dieser Lösung bei 595 nm gemessen. In Abhängigkeit der festgestellten Proteinkonzentration und der zu untersuchenden Phosphorylierungsstelle wurde $20\text{-}40\mu\text{g}$ der Lösung auf die entsprechenden Gele aufgetragen.

Reagenz	Mengenangabe
1:10 verdünnten Proteinlysats	$2\mu\text{l}$
Wasser	$800\mu\text{l}$
Bradfordreagenz	$200\mu\text{l}$

Tabelle 5 Bradford-Methode

Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Titinproteine wurden modifizierte Gele verwendet. Titin liegt mit einer Größe von ca. 3500 kDa deutlich über dem Durchschnitt anderer Proteine. Aus diesem Grund wurde eine geringere Acrylamid-Konzentration zur Auftrennung des Titins verwendet. Es handelte sich um 1.9% bis 2.3% denaturierende Natriumdodecylsulphate-Polyacrylamid (SDS-) Gele. Nach Herstellung des Puffers, mit den unten aufgeführten Reagenzien (Tab. 6), wurde dieser im Wasserbad auf 48°C erhitzt. Anschließend wurde das Ammoniumperoxodisulfat (APS) sowie die stabilisierende $1,5\%$ -Agarose hinzugegeben. Die entsprechenden Mengenangaben können der Tabelle 6 entnommen werden.

Lösung	1,9% Gel	2,1% Gel	2,3% Gel
30% Acrylamide-/Bisacrylamide	1.30 ml	1.45 ml	1.60 ml

H2O (MiliQ)	6.65 ml	6.50 ml	6.35 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml
Sodiumdodecylsulphate-Polyacrylamid (SDS) 20%	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	11.50 µl	11.50 µl	11.50 µl
APS	150 µl	150 µl	150 µl
1,5% Agarose	6.78 ml	6.78 ml	6.78 ml

Tabelle 6 Zusammensetzung der 1,9%-, 2,1%-, 2,3%-Agarose-stabilisierten SDS-Polyacrylamid-gele zur Analyse von Titin

Nach erneuter gründlicher Vermischung erfolgte das Beladen der Glasplatten mit dem entsprechenden Gel. Nach ca. zwei-stündiger Polymerisation bei Raumtemperatur waren die Gele verwendungsbereit.

Zur Auftrennung kleinere Proteine wie der PKC α (75 kDa) wurden 10 %, 12.5 % oder 15 % denaturierende SDS-Gele verwendet. Zunächst erfolgte die Zubereitung eines Trenngelpuffers. Nach dessen Polymerisation wurde zusätzlich ein 4% Sammelgel hergestellt und oberhalb des Trenngelpuffers aufgetragen. Für die genaue Zusammensetzung siehe Tab. 7.

Lösung	10% - Trenngel	12.5 % - Trenngel	15 % - Trenngel	4%-Sammelgel
30% Acrylamide- / Bisacrylamide	5 mL	6.25 mL	7.5 mL	<i>0.667 ml</i>
H2O, deionisiert	6.25 ml	5 ml	3.75 ml	<i>3.025 ml</i>
4x SDS-Trenngelpuffer	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	-
4x SDS-Sammelgelpuffer	-	-	-	<i>1.25 ml</i>
TEMED	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	<i>15 µl</i>
APS	75 µl	75 µl	75 µl	<i>50 µl</i>

Tabelle 7 Zusammensetzung der 10%-, 12,5%-, 15%- SDS-Polyacrylamid-Trenngele sowie des 4% Sammelgels zur Analyse der PKC α

Für die anschließende Gelelektrophorese wurde das vertikale Biometra Minisystem verwendet. Als elektrisches Leitmedium diente der 1 \times Laufpuffer.

Die Gele wurden dabei mit Proben der annähernd gleichen Proteinkonzentration beladen. Es handelte sich hierbei um in Titinprobenpuffer solubilisiertes Gewebe. Dieses Gewebematerial wurde auf die 1,9%-2,3% Titingele aufgetragen und innerhalb einer Stunde bei einer Stromstärke von 2,5 mA und anschließend für weitere 3h bei 5 mA/Gel aufgetrennt.

Zur Analyse der PKC α wurden die 10-12%igen SDS-Gele verwendet und das Gewebe zunächst mit einer Stromstärke von 3,5 mA und anschließend mit bis zu 7,5 mA/Gel für 3h aufgetrennt.

Beim Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde zunächst eine Stromstärke von 20 mA angelegt, und diese später auf bis zu 30mA für insgesamt 40 min erhöht.

Western Blotting

Um den Phosphorylierungsstatus der Proteingemische durch Immundetektion zu evaluieren, wurden die aufgetrennten Proteinbanden anschließend mit dem Turboblot-System auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Hierfür wurde ein elektrisches Feld angelegt. Als positiver Pol wurden fünf 3MM Whatman-Papiere der Größe 3x5cm in Anodenpufferlösung gelegt und weitere fünf in eine Kathodenpufferlösung, die anschließend als negativer Pol fungierten. Die Anodenpuffer-getränkten Whatman-Papiere wurden als erstes in den Blotting Apparat gelegt. Nun folgte eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran sowie das SDS- Gel. Zuletzt wurden die Kathodenpuffer-getränkten Whatman-Papiere hinzugefügt.

Bei Übertragung der Proteine auf die Membran mithilfe des Trans-Blot Turbo Transfer System von Bio Rad wurden 1.5 A bei 20 V verwendet. Der Blotting Prozess dauerte jeweils zwischen 12 Minuten (SDS- Gele) und 20 Minuten (Titingele). Um den Erfolg des Proteins-transfers darzustellen, wurden die Membranen mit einer Serva-Blue Lösung eingefärbt und anschließend durch Destain wieder entfärbt. Um letzte Farbrückstände zu entfernen, erfolgte anschließend eine weitere Behandlung der Membranen mit 1 x TBST. Nachfolgend wurden die Blots in eine Lösung aus 2% BSA in TBST gelegt, dadurch wurden mögliche unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers blockiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die entsprechenden primären Antikörper (p11.878, p.12.022, totalPEVK, pPKC, totalPKC) nach Vorgabe (siehe Tabelle 4 des Materialteils) in 1 x TBST verdünnt und die Blots hinzugefügt und über Nacht bei 4°C auf den Rollmischer gelegt. Am nächsten Morgen wurden die Blots 3 Mal mit 1 x TBST gewaschen, um danach wiederum in einer Lösung aus 1 x TBST und entsprechend verdünntem sekundären Antikörper (antirabbit-Antikörper) für 2 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Vor dem Scannen wurden die Blots nochmals gewaschen und zusätzlich mit der ECL (westar nc ultra 2.0)- Reagenz, bestehend aus Luminol und Enhancer, behandelt. Das Luminol reagierte mit dem Horseradish Peroxidase (HRP-) Enzym, das an den sekundären Antikörper gebunden war. Die entstehende Reaktion wurde vom Fuji LAS-4000 Phospho-Chemolumineszenz Imager detektiert und dargestellt.

2.1.7 Biophysikalische Methoden

Kraftmessung

Die zuvor gefrorenen Psoasproben wurden für ein bis zwei Stunde auf Eis durch Einlegen in eine Relaxationslösung mit 2%-Triton-X-100 gehäutet. Weitere Lösungszusätze stellten das 30 mM 2,3-Butandionmonoxim (BDM), Dithiothreitol (DTT), ein Protease- sowie ein

Phosphataseinhibitorcocktail dar. Durch diese Substanzzusammensetzung wurde die Permeabilität der Zellen erhöht, die Aktivität vermindert sowie eine Kontraktion der Myofibrille und der Abbau des Titinproteins verhindert. So wurden die Bedingungen zur Messung der ausschließlich passiven Kräfte von Titin geschaffen. Anschließend wurden die gehäuteten Proben mithilfe kleiner Minutiennadeln in der Relaxationslösung aufgespannt und zwei Mal jeweils 15 min gewaschen. Aus den Muskelproben wurden Muskelfasern mit einer Breite von 200-400 μm unter dem Mikroskop mithilfe von Pinzette und Skalpell präpariert und anschließend in Relaxationslösung wieder auf Eis gelegt. Alle Messungen fanden anschließend bei Raumtemperatur statt. Pro Probe war zum Teil das Präparieren von bis zu 10 Fasern notwendig, um auf die gewünschte Menge verwertbarer Messungen zu kommen ($n=5$). Schwierig gestaltete sich hierbei vor allem das Einspannen der fragilen Muskelfasern, wobei die diabetischen Proben aufgrund des hohen Fettgehaltes besonders vorsichtig behandelt werden mussten. Beim Einspannen der Kontrollproben (db/+ sham) war das Präparieren von 5-7 Fasern hingegen meistens ausreichend, um auf die gewünschte Anzahl $n=5$ zu kommen.

Die Fasern wurden nacheinander in die Klemmen der Fasermessapparatur MYOSCOPE-SKINNED der Firma myotronic Heidelberg eingespannt (siehe Abb. 7).

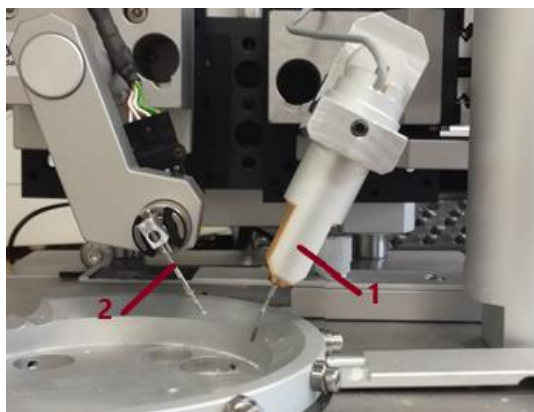


Abb. 7 Fasermessapparatur MYOSCOPE-SKINNED der Firma Myotronic Heidelberg. Die mit 1 markierte Vorrichtung entspricht dem Piezo-Motor, der mit Hilfe der MYODAT Software die Länge der Muskelfasern kontrolliert. Die mit 2 markierte Vorrichtung stellt hingegen den sog. Kraftaufnehmer dar.

Eine dieser Klemmen war mit einem piezogesteuerten Längengeber verbunden (Piezo-Motor, in Abb. 7 mit 1 markiert), die andere mit einem Kraftaufnehmer (in Abb. 7 mit 2 markiert). Unter Verwendung der Software myodat konnten die Kraftausschläge registriert werden. Zunächst wurde der Abstand der Klemmen solange manuell erweitert, bis das Computerprogramm einen Kraftausschlag detektierte. Diese detektierte Länge entsprach der Ausgangslänge der Muskelfasern und wurde durch Eingabe des Wertes festgehalten. Anschließend wurde das Computerprogramm so eingestellt, dass der Längengeber des Gerätes eine stufenweise Dehnung der Muskelfasern auf 150% der Ausgangslänge hervorrief, die entsprechenden Kraftausschläge wurden wiederum detektiert und aufgezeichnet.

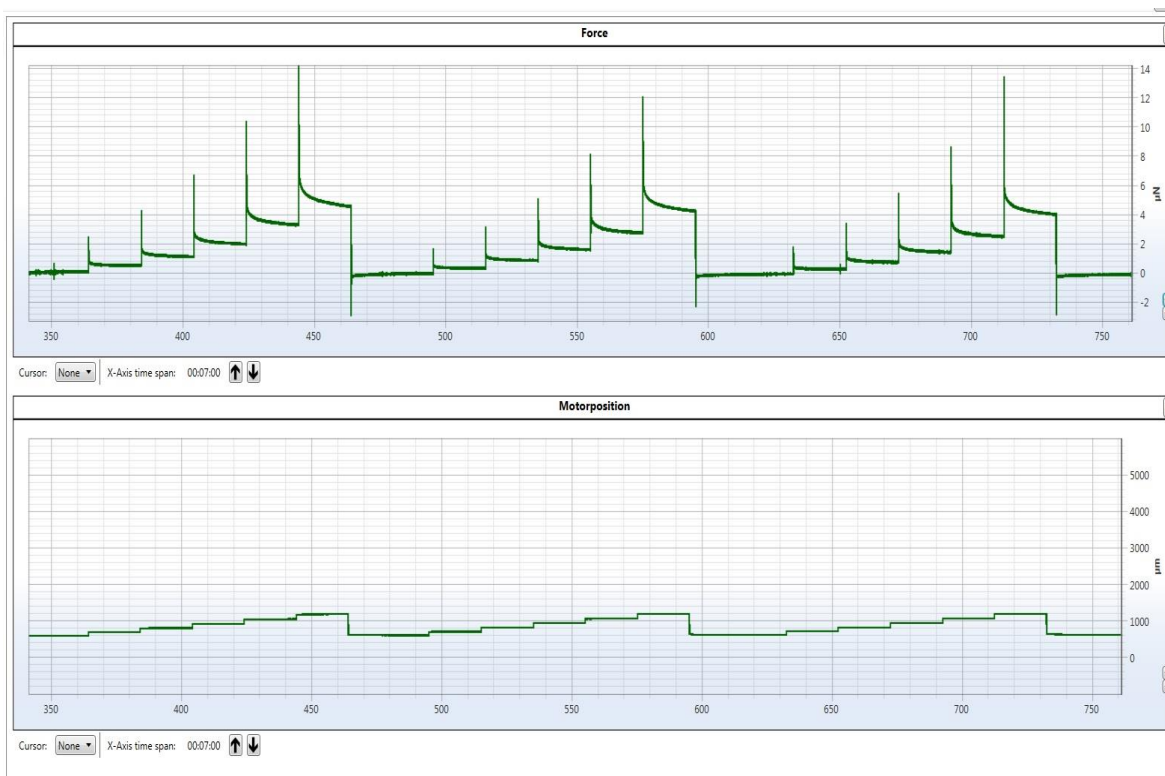


Abb. 8 Beispiel einer passive Längenveränderung einer Muskelfaser des M. psoas. Angabe der Kraftentwicklung in mN auf der Y-Achse im oberen Teil der Abbildung und Angabe der Faserlänge in μm auf der Y-Achse im unteren Teil der Abbildung.

Die stufenweise Dehnung der Fasern wurde viermal hintereinander durchgeführt. Hierbei wurde jeweils der erste Durchgang nicht in die Messung einbezogen, da es in den meisten Fällen zu Abweichungen aufgrund von anfänglicher Einstellbewegungen der Fasern zwischen den Klemmen kam.

2.1.8 Analyse der Daten

Die mit Imperial protein stain[®] gefärbten Western Blots wurden mit Hilfe der ImageJ Software ausgewertet. Auf Basis dieser Daten wurden Balkendiagramme erstellt sowie die Standardabweichungen ermittelt. Die mögliche statistische Signifikanz der Veränderung des Phosphorylierungsstatus wurde mithilfe des one-way Anova untersucht. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der passiven Kraftentwicklung von Fasern des Psoas-muskels wurde der two-way Anova verwendet. Beide Tests fanden unter Korrektur des „Sidak’s multiple comparisons–Tests“ statt. Sobald der Wert $p=0,05$ unterschritten wurde, wurden die Ergebnisse als signifikant gewertet.

2.1.9 Software

Die folgenden Programme wurden zur Vervollständigung dieser Dissertation verwendet: Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, Microsoft Word, Myodat, Adobe Photoshop, ImageJ, GraphPad Prism 8 und SigmaPlot 10.

3 Ergebnisse

3.1 Modifikation der Phosphorylierung der PEVK Region sowie des Aktivierungsloops der PKC α im Titin der Psoasmuskulatur

Die folgenden Ergebnisse basieren auf einer Versuchsreihe mit mindestens $n=7$ Versuchstieren in der Kontrolltiergruppe und $n=5$ bis $n=8$ Versuchstieren in allen anderen Versuchsgruppen. Von jedem Versuchstier wurden mindestens $n=3$ Muskelfasern untersucht (eine Ausnahme $n=2$: db/db I/R 6, Ser11878). Lediglich die Analyse der phospho-PKC α wurde bei den db/+ I/R Tieren mit nur $n=4$ Versuchstieren durchgeführt.

Im Zuge der Studie wurden im Skelettmuskel der Versuchstiere bestimmte Phosphorylierungsstellen in der PEVK-Region des Sarkomerproteins Titin untersucht. Hierbei handelt es sich um die Serinreste Ser11878 und Ser12022. Es wurden speziell diese Positionen betrachtet, da sie sich im Falle eines Typ-2 Diabetes sowie nach einer Myokardischämie im Herzmuskel als wichtige Modifikationspunkte der Elastizität des Titinproteins herausgestellt haben (Hidalgo et al., 2009; Hudson, Hidalgo, Gotthardt, & Granzier, 2010; Kötter et al., 2016). Da die PKC α eine mögliche modifizierende Kinase der beiden genannten Positionen darstellt, wurde ihre Aktivität im weiteren Verlauf ebenfalls untersucht. Als Maß für ihre Aktivität wurde der Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloops der Kinase an Position T497 erhoben (Krüger & Kötter, 2016).

3.1.1 Unterschied des Phosphorylierungsstatus in der Titin PEVK-Region der diabetischen Versuchstiere (db/db) bezogen auf die nicht-diabetischen Versuchstiergruppen (db/+)

Zunächst wurde das Phosphorylierungslevel der Serinreste Ser11878 und Ser12022 der Titin PEVK-Region der diabetischen Versuchstiere (db/db sham) mit demjenigen der nicht-diabetischen Kontrolltiergruppe (db/+ sham) verglichen. Hierbei wurde eine statistisch signifikante Verringerung der Phosphorylierung an der Stelle Ser11878 ($p=0,0069$) bei den diabetischen Gewebeproben nachgewiesen. Die Stelle Ser12022 ($p=0,1592$) zeigte lediglich dieselbe Tendenz einer verminderten Phosphorylierung, jedoch ohne statistische Signifikanz (siehe Abb. 9).

Im Zuge dessen wurde außerdem ein Vergleich zwischen den diabetischen Mäusen mit induziertem Myokardinfarkt (db/db I/R) zu den nicht-diabetischen Versuchstieren mit induziertem Myokardinfarkt (db/+ I/R) gestellt. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verringerung der Phosphorylierung an der Stelle Ser11878 ($p=0,0003$) bei den diabetischen Gewebeproben. Die Stelle Ser12022 der PEVK Region wies wiederum keine signifikante Verringerung des Phosphorylierungsstatus auf ($p=0,9132$) (siehe Abb. 9)

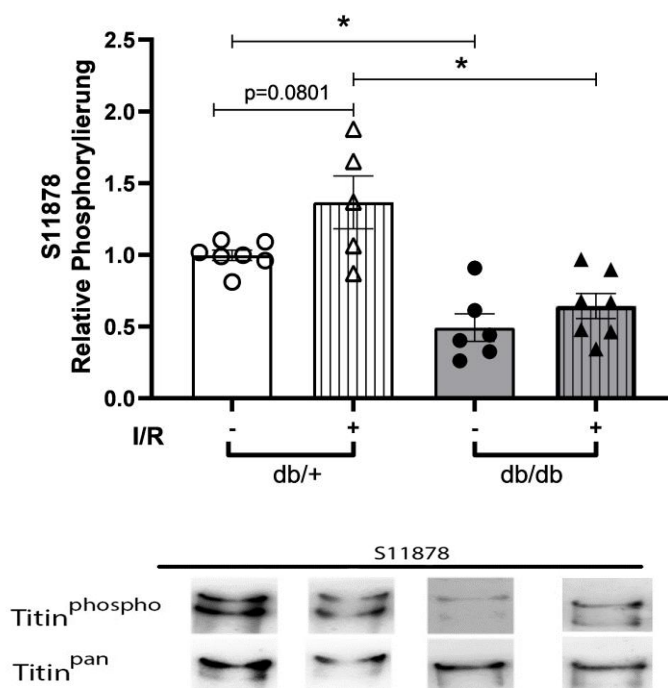
3.1.2 Darstellung des veränderten Phosphorylierungslevels der Versuchstiergruppen in Folge eines akuten Myokardinfarkts

Anschließend wurden die Veränderungen in der Titin PEVK-Region untersucht, die sich auf die Folgen eines akuten Myokardinfarktes zurückführen ließen. Dazu wurde als erstes der Phosphorylierungsstatus an der Stelle Ser11878 der PEVK-Region der Kontrolltiergruppe (db/+ sham) erhoben und mit demjenigen der Kontrolltiere mit induzierter I/R verglichen (db/+ I/R). Hierbei wurde im Falle der ischämischen Versuchstiere eine deutliche, jedoch statistisch nicht signifikante, Erhöhung der Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p=0,0801$) festgestellt. Für die Position Ser12022 war eine ähnliche Tendenz zu erkennen ($p=0,1669$) (siehe Abb. 9).

Im Folgenden wurden die oben aufgeführten Phosphorylierungsstellen der elastischen Titinregion ebenfalls bei den diabetischen Versuchstieren untersucht. Vergleicht man den Phosphorylierungsstatus der diabetischen Versuchstiere bei denen eine 60-minütige Ischämie mit anschließender 24-stündiger Reperfusion induziert wurde (db/db I/R) mit dem der diabetischen Tiere ohne I/R (db/db sham), zeigt sich dieselbe Tendenz der I/R-induzierten Erhöhung des Phosphorylierungsstatus an den Stellen Ser11878 sowie Ser12022 der PEVK Region wie schon bei den nicht diabetischen Versuchstieren. Allerdings konnte auch in diesem Fall keine statistische Signifikanz des Anstiegs nachgewiesen werden (S11878: $p=0,7529$ und S12022: $p=0,1669$) (siehe Abb. 9).

A)

Ser11878



A) Ser12022

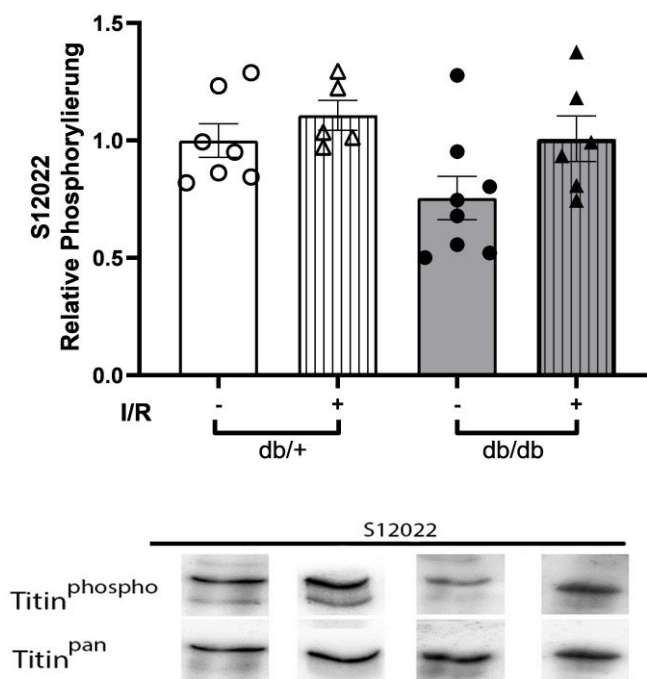


Abb. 9 Phosphorylierungsstatus der Titin PEVK-Region im Skelettmuskel nach induziertem Myokardinfarkt und unter diabetischer Stoffwechsellage. Die Graphiken stellen die statistische Auswertung der Ergebnisse der Western Blot Analysen dar. Die Mittelwerte der Versuchstiergruppen werden durch die abgebildeten Balken dargestellt, die Standardfehler sind ebenfalls eingezeichnet. Es handelt sich um die Mittelwerte des Phosphorylierungsstatus an den Positionen Ser11878 (Abb. 9A) und Ser12022 (Abb. 9B) der PEVK-Region. Zusätzlich werden die Mittelwerte der einzelnen Versuchstiere in Form von Symbolen dargestellt. In Abb. 9A beruht der Mittelwert der Versuchsgruppe db/+ sham auf n=7 Versuchstieren, db/+ I/R auf n=5, db/db sham auf n=6 und db/db I/R auf n=7. Die abgebildeten Sternchen (*) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der einzelnen Versuchsgruppen. Die Graphik in Abb. 9B beruht auf der Auswertung der sham Gruppe mit n=7 (db/+) und n=8 (db/db) sowie der Auswertung der I/R-Gruppen auf n=5 (db/+ I/R) und n=6 (db/db I/R) Versuchstieren. Der Mittelwert der einzelnen Versuchstiere beruht auf der Messung von mindestens n=3 Muskelfaserproben desselben Tiers. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der one-way Anova Test verwendet.

3.1.3 Aktivität der Proteinkinase-C- α (PKC α)

Die PKC α wird im Herzen für die Phosphorylierung der Titin PEVK-Region an den Positionen Ser11878 und Ser12022 verantwortlich gemacht (Hidalgo et al., 2009). Aufgrund dessen wurde im Zuge der Überprüfung dieser Phosphorylierungsstellen im Skelettmuskel auch die Aktivität der PKC α überprüft. Als Maß für ihre Aktivität wurde die Phosphorylierung des Aktivierungsloops an Position T497 (Krüger & Kötter, 2016) ausgewertet. In den untersuchten Proben der Psoasmuskulatur konnte allerdings weder bei den Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage noch bei den Versuchstieren mit induziertem Myokardinfarkt eine signifikante Veränderung der PKC α Phosphorylierung festgestellt werden. Es zeigte sich

lediglich eine tendenziell gesteigerte Phosphorylierung des Aktivierungsloops der PKC α bei den Mäusen mit induzierter Ischämie (siehe Abb. 10).

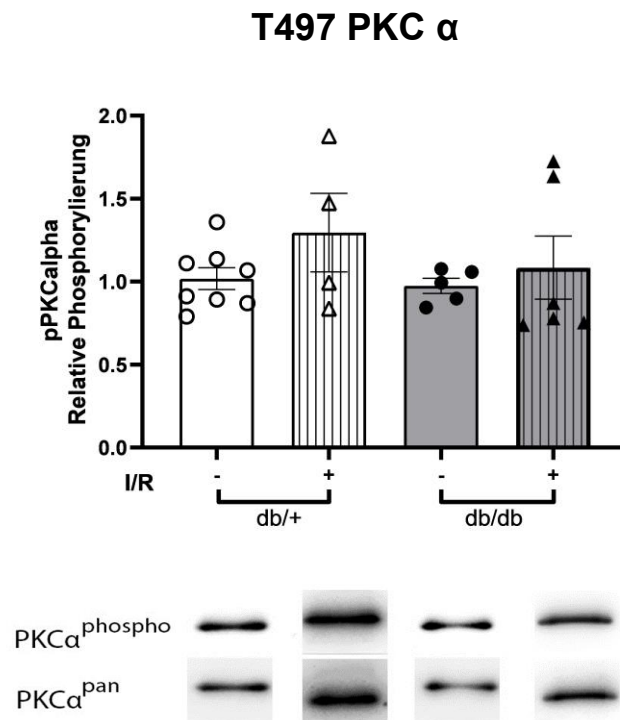


Abb. 10 Darstellung des Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloop T497 der PKC α . Die Ergebnisse basieren auf der Auswertung der Western Blot Analyse. Es werden die Mittelwerte der Versuchsgruppen in Form von Balken, inkl. Standardfehler, dargestellt. Des Weiteren zeigt die Graphik die Mittelwerte der einzelnen Versuchstiere in Form von Symbolen. Die dargestellten Mittelwerte der Versuchsgruppen beruhen auf der Auswertung der Daten von $n = 8$ (db/+ sham), $n = 4$ (db/+ I/R), $n = 5$ (db/db sham) und $n = 6$ (db/db I/R) Versuchstieren. Der Mittelwert der einzelnen Versuchstiere beruht auf der Messung von mindestens $n=3$ Muskelfaserproben desselben Tiers. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der one-way Anova Test verwendet.

3.1.4 Überblick über die Mittelwerte \pm Standardfehler der einzelnen Versuchsgruppen, die auf dem Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloops an der Position T497 der PKC α sowie der Phosphorylierung der PEVK Region an den Stellen Ser11878 und Ser12022 beruhen

	Probe	Mittelwert	Standardfehler
Ser11878	db/+ sh	0,995	$\pm 0,037$
	db/+ I/R	1,31	$\pm 0,058$
	db/db sh	0,493	$\pm 0,040$
	db/db I/R	0,666	$\pm 0,035$
Ser12002	db/+ sh	0,996	$\pm 0,056$
	db/+ I/R	1,13	$\pm 0,026$
	db/db sh	0,732	$\pm 0,035$
	db/db I/R	0,948	$\pm 0,028$
PKC α	db/+ sh	1,027	$\pm 0,065$
	db/+ I/R	1,187	$\pm 0,080$
	db/db sh	1,037	$\pm 0,046$
	db/db I/R	1,049	$\pm 0,062$

Tabelle 8 Darstellung der errechneten Mittelwerte \pm Standardfehler, die auf dem Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloops an Position T497 der PKC α sowie der Phosphorylierung der PEVK-Region an den Positionen Ser11878 und Ser12022 beruhen. Die aufgeführten Mittelwerte und Standardfehler beruhen auf der statistische Auswertung der Ergebnisse der Western Blot Analyse (Ausgewertete Western Blots der einzelnen Versuchsgruppen (Ser 11878, Ser12022, PKC α zusammengefasst): db/+ sham: n=77; db/+ I/R: n=21; db/db sham: n=32; db/db I/R: n=24). Die Mittelwerte stellen den relativen Phosphorylierungsstatus der einzelnen Versuchsgruppen an den Positionen Ser11878 und Ser12022 der PEVK-Region sowie den relativen Phosphorylierungsstatus des Aktivierungsloops an Position T497 der PKC α dar. Auf den Werten dieser Tabelle beruhen die in Abb. 9 und 10 dargestellten Balken inkl. eingezeichneter Standardfehler.

3.2 Titin-abhängige Veränderung der passiven Spannung im Skelettmuskel unter diabetischer Stoffwechsellage und nach akutem Myokardinfarkt

Um die Auswirkungen der modifizierten Titin-Phosphorylierung auf die mechanischen Eigenschaften des Muskels zu bestimmen, wurden Messungen zur Titin-abhängigen passiven Spannung der diabetischen Proben des Psoasmuskels durchgeführt und diese im Anschluss den Ergebnissen der nicht-diabetischen Kontrollgruppen gegenüber gestellt. Anschließend wurde die gemessene passive Spannung der Proben mit I/R mit der passiven Spannung der Gewebeprobe ohne I/R verglichen. Dafür wurden zunächst die Ausgangslängen der jeweiligen Muskelfasern bestimmt. Anschließend wurden die Fasern stufenweise auf 150% der Ausgangslänge gedehnt (siehe Abb.11).

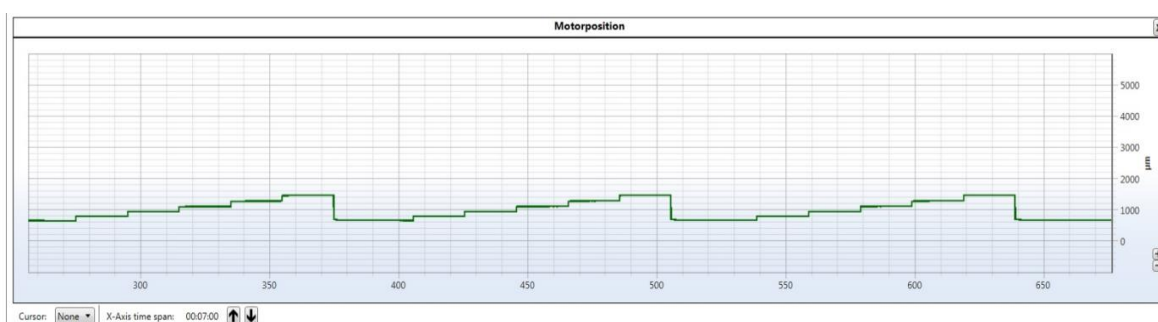


Abb. 11 Beispiel eines Dehnungsprotokolls für die stufenweise Längenänderung einer Muskelfaser des M. psoas. Ausgehend von einer Ruhe-Faserlänge wurden die einzelnen Muskelfasern in jeweils 5 Stufen um jeweils 10% gedehnt. Dabei erfolgte eine Dehnung der Muskelfasern für jeweils 7 Sekunden auf 110%, 120%, 130%, 140% und 150% der Ausgangslänge. Anschließend erfolgte die erneute Relaxation auf die Ausgangslänge zurück. Angabe der Faserlänge in µm auf der Y-Achse.

Die dabei entstehende Kraftentwicklung (mN) wurde durch den Kraftaufnehmer detektiert und aufgezeichnet (siehe Abb.12). Im Anschluss an die Kraftmessungen wurde unter Verwendung eines Objektmikrometers der Faserdurchmesser und daraus unter Annahme eines kreisförmigen Faserquerschnitts die Querschnittsfläche bestimmt. Mit Hilfe dieses Wertes wurde die passive Spannung (Kraftentwicklung der einzelnen Fasern bezogen auf ihre Querschnittsfläche in $\text{mN}/\mu\text{m}^2$) der untersuchten Muskelfasern ermittelt.

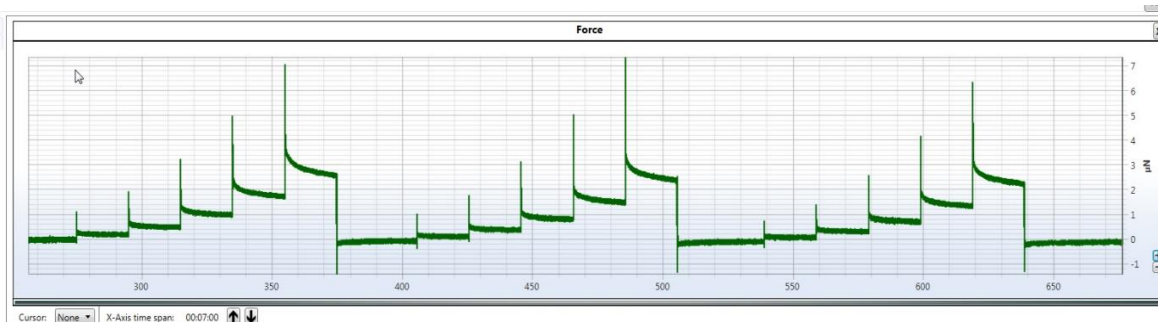


Abb. 12 Beispiel der passiven Kraftentwicklung einer Muskelfaser des M. psoas durch stufenweiser Längenveränderung. Jede Dehnungsstufe wurde für 7 Sekunden gehalten. Anfänglicher

Ausschlag der Kraft bei Dehnung durch den Längengeber. Anschließendes Einpendeln auf den gemessenen Wert der passiven Kraftentwicklung. Angabe der Kraftentwicklung in μN auf der Y-Achse. Nach anschließendem Einbeziehen der Kalibrationsdaten wurden die Werte in mN umgerechnet.

Da ausschließlich die passive Spannung der Muskelfasern gemessen werden sollte, wurden die Fasern zunächst mit Hilfe des Detergenz Triton-X-100 permeabilisiert und dadurch eine aktive, Ca^{2+} -abhängige Kraftentwicklung verhindert. Die Entwicklung der passiven Spannung der Psoasmuskulatur bei Dehnung wurde im Folgenden bei den unterschiedlichen Versuchstiergruppen (db/+ sham, db/db sham, db/+ I/R, db/db I/R) detektiert. Die errechneten Mittelwerte ergaben sich aus Messungen mit Psoasmuskulatur-Proben von je $n=5$ Versuchstieren pro Gruppe sowie einer Untersuchung von mindestens $n=5$ Muskelfasern pro Versuchstier.

3.2.1 Titin-abhängige passive Spannung im Skelettmuskel der diabetischen Versuchstiere (db/db) verglichen mit den nicht-diabetischen Versuchstiergruppen (db/+)

Zunächst wurden die Ergebnisse der Versuchsgruppen ohne diabetische Stoffwechsellage (db/+) mit den Ergebnissen der diabetischen Mäuse verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Werte der diabetischen Versuchstiere ohne I/R (db/db sham) bezüglich der entstehenden passiven Spannung bei Dehnung annähernd den Werten der passiven Spannung der nicht-diabetischen Kontrolltiergruppe (db/+ sham) entsprachen (siehe Tab.9). Dasselbe galt für die Messungen der passiven Spannung der diabetischen Versuchstiere mit I/R (db/db I/R) verglichen mit den nicht-diabetischen Mäusen mit I/R (db/+ I/R). Auch hier zeigten sich bei der gemessenen passiven Spannung während der einzelnen Dehnungsstufen (zusätzliche Dehnung um 10%-50% der Ausgangslänge) ähnliche Werte (siehe Abb. 13).

Db/+ sham-Gruppe	
MITTELWERT 110% Dehnung:	0,00871112 nM/ μm^2
MITTELWERT 120% Dehnung:	0,02305481 nM/ μm^2
MITTELWERT 130% Dehnung:	0,04766103 nM/ μm^2
MITTELWERT 140% Dehnung:	0,08589105 nM/ μm^2
MITTELWERT 150% Dehnung:	0,14490054 nM/ μm^2
MITTELWERT Relaxation:	-0,0011912 nM/ μm^2
Db/Db sham-Gruppe	
MITTELWERT 110% Dehnung	0,0073656 nM/ μm^2
MITTELWERT 120% Dehnung	0,02130889 nM/ μm^2
MITTELWERT 130% Dehnung	0,0479832 nM/ μm^2
MITTELWERT 140% Dehnung	0,08532625 nM/ μm^2
MITTELWERT 150%	0,14302503 nM/ μm^2
MITTELWERT Relaxation	-0,0008749 nM/ μm^2

Tabelle 9 Darstellung der Mittelwerte der passiven Spannung der db/+ sham- und db/db sham-Muskelfaserproben bei Dehnung um zusätzlich 10%-50% der Ausgangslänge. Der obere Abschnitt der Tabelle gibt die Mittelwerte der Kontrolltiergruppe (db/+ sham), der untere Abschnitt die Mittelwerte der diabetischen Versuchstiergruppe (db/db sham) an. Alle Tabellenwerte beruhen auf der Auswertung von Messungen mit $n = 5$ Versuchstieren und sind in der Einheit nM/ μm^2 angegeben und stellen damit die Kraft/Querschnitt dar

3.2.2 Titin-abhängige Veränderung der passiven Spannung im Skelettmuskel nach 60-minütiger Ischämie und anschließender 24-stündiger Reperfusion (I/R)

Im weiteren Verlauf wurde die Titin-abhängige passive Spannung der I/R Proben (db/+ I/R und db/db I/R) mit der jeweiligen Kontrolltiergruppe ohne I/R (db/+ sham und db/db sham) verglichen. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, zeigt sich ab einer zusätzlichen Dehnung um 30% der Ausgangslänge der Muskelfasern eine Kurvendivergenz zwischen den Graphen der Tiere mit induzierter I/R und den Sham-Tiergruppen ohne I/R. Sowohl bei den diabetischen als auch bei den nicht-diabetischen Versuchstieren konnte der I/R-induzierte Anstieg der passiven Spannung detektiert werden. Insgesamt konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied im two-way ANOVA nachgewiesen werden. In Abb. 14 wird in Form eines Balkendiagramms nochmals der relative Unterschied der entstehenden passiven Spannung bei Dehnung zwischen I/R- und Sham-Gruppe dargestellt. Da erst ab 30% zusätzlicher Dehnung eine Divergenz erkennbar wurde, sind lediglich die Dehnungsstufen der Muskelfasern auf zusätzliche 30%, 40% und 50% ihrer Ausgangslänge dargestellt.

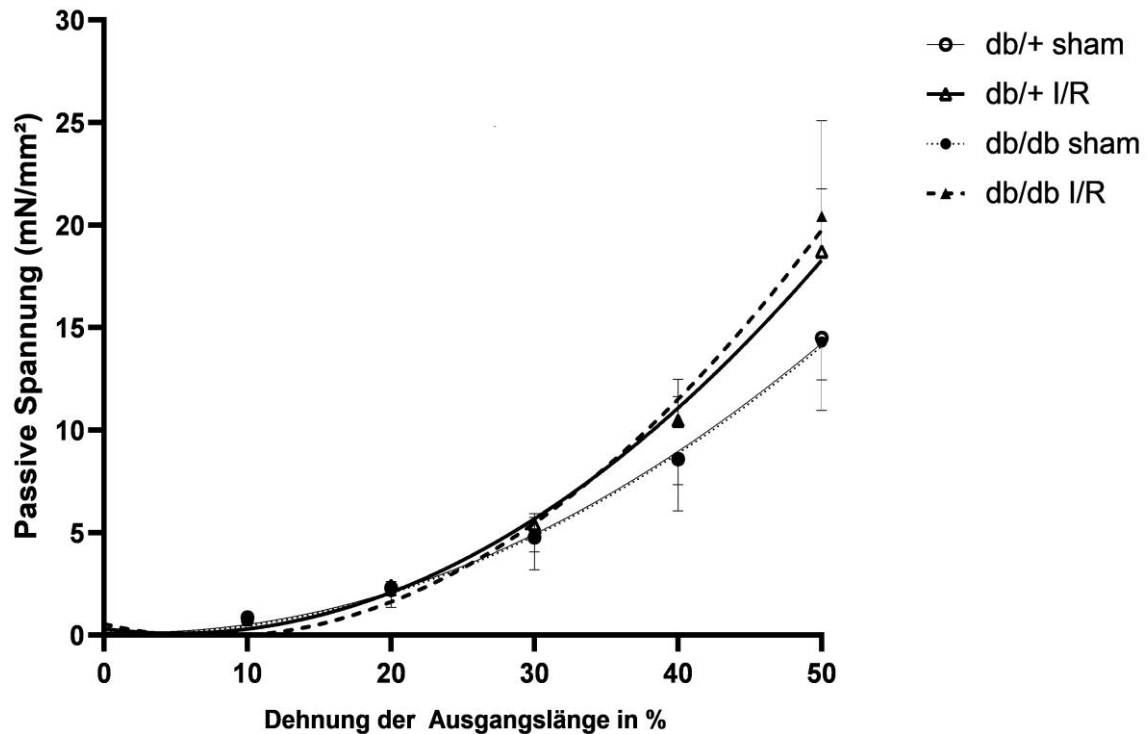
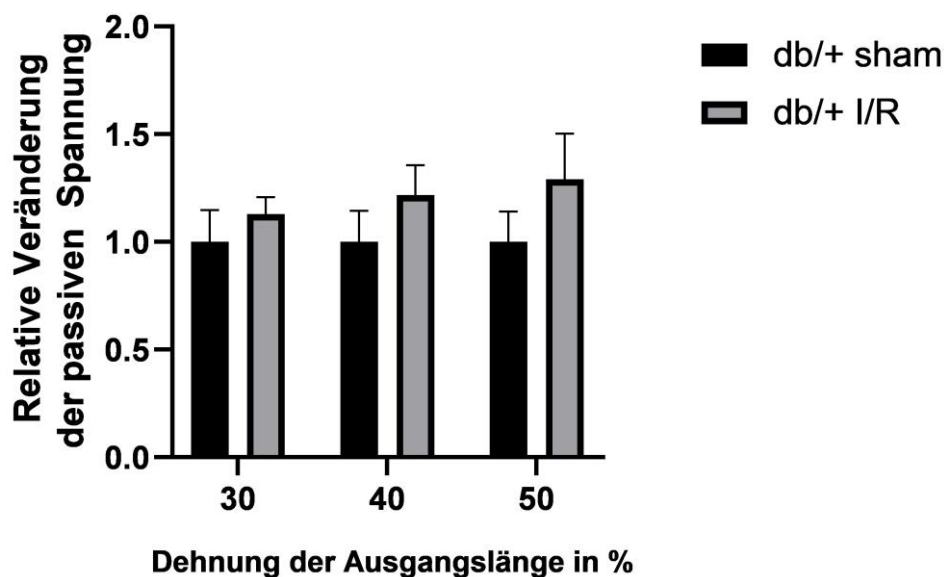


Abb. 13 Veränderung der passiven Spannung im Psoasmuskel bei Dehnung. Die Abbildung zeigt die Entwicklung der passiven Spannung der Psoasmuskulatur in Abhängigkeit vom Dehnungsgrad. Die entstehende passive Spannung ist in mN/mm^2 auf der y-Achse angegeben. Die zusätzliche Dehnung der Ausgangslänge der Muskelfasern ist in 10er Schritten auf der x-Achse in % angegeben. Die Muskelfasern wurden mit einer Zunahme um bis zu 50% ihrer Ausgangslänge gedehnt. Eine erste Kurvendivergenz ist ab einer Dehnung, um zusätzliche 30% der Ausgangslänge zu erkennen. Ab diesem Dehnungsgrad zeigen die Kurvenverläufe, dass im Falle der I/R-Gruppen eine höhere passive Spannung bei gleicher prozentualer Dehnung im Vergleich zu den Kontrollgruppen aufgebaut wird. Eine statistische Signifikanz ließ sich für den I/R-induzierten Anstieg der passiven Spannung jedoch nicht nachweisen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des two-way Anova unter Korrektur des „Sidak’s multiple comparisons-Tests“ überprüft. Die Mittelwerte, auf denen der Graph beruht, ergaben sich aus Messungen mit Psoasmuskulatur-Proben von je $n=5$ Versuchstieren pro Versuchsgruppe sowie einer Untersuchung von min. $n=5$ Muskelfasern pro Tier. Bei den dargestellten Linien handelt es sich um eine polynomische Kurvenanpassung.

A)



B)

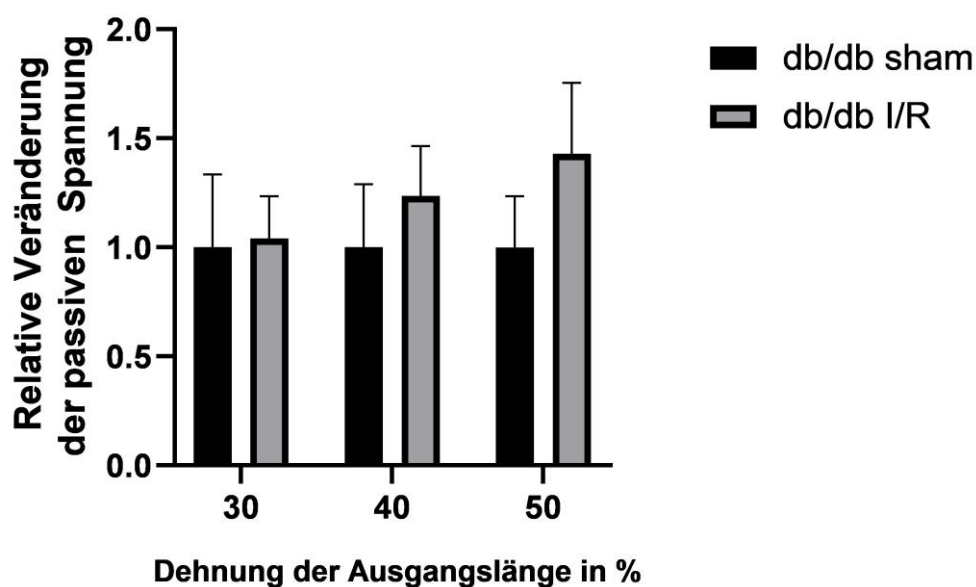


Abb. 14 Vergleich der Entwicklung der passiven Spannung im Psoasmuskel der I/R-Gruppen bezogen auf ihre sham-Gruppen bei einer zusätzlichen Dehnung um 30%, 40% und 50% der Ausgangslänge. Die gemessenen Werte der passiven Spannung der Sham-Tiergruppen (schwarze Balken) wurden auf den Wert eins genormt. Die abgebildeten Balken der Vergleichsgruppen (I/R-Gruppen: hellgrau) stellen demnach den relativen Unterschied der entstehenden passiven Spannung bezogen auf die Sham-Gruppe dar. Abb. A zeigt den relativen Unterschied der passiven Spannung der db/+ I/R-Gruppe bei einer zusätzlichen Dehnung um 30%, 40% und 50%, normiert auf die db/+ Sham-Gruppe. Abb. B zeigt ebenfalls den relativen Unterschied der passiven Spannung bei einer zusätzlichen Dehnung um 30%, 40% und 50%, hier werden die Werte der db/db I/R-Gruppen

normiert auf die db/db Sham-Gruppe dargestellt. Gezeigt werden die Werte, die durch Messungen mit Psoasmuskulatur-Proben von je $n = 5$ Versuchstieren pro Versuchsgruppe sowie einer Untersuchung von min. $n=5$ Muskelfasern pro Versuchstier ermittelt wurden. Die entsprechenden Standardfehler sind ebenfalls abgebildet. Es zeigte sich ein deutlicher, statistisch jedoch nicht signifikanter, Anstieg der passiven Spannung der I/R-Gruppen im Vergleich mit ihren Sham-Gruppen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des two-way Anova unter Korrektur des „Sidak`s multiple comparisons–Tests“ überprüft

4 Diskussion

4.1 Einfluss eines Typ-2-Diabetes auf das Phosphorylierungslevel der PEVK-Region und der PKC α -Aktivität im Titin der Skelettmuskulatur

In der vorliegenden Studie zeigte sich in den diabetischen Skelettmuskelproben (db/db sham bezogen auf db/+ sham sowie db/db I/R bezogen auf db/+ I/R) eine statistisch signifikante Verringerung des Phosphorylierungslevels an der Position Ser11878 sowie die gleichen Tendenz, ohne statistische Signifikanz, am Serinrest Ser12022 der PEVK-Region des Titin. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, vergleicht man es mit den Ergebnissen von Studien bezüglich der Modifikation der PEVK-Region des kardialen Titins bei diabetischer Stoffwechsellage. In den Kardiomyozyten zeigte sich unter diabetischer Stoffwechsellage keine Hypophosphorylierung, sondern im Gegenteil sogar eine Hyperphosphorylierung in der entsprechenden Region des Titinproteins. Genauer gesagt, vergleicht die Studie Hopf et. al diabetische mit nicht-diabetischen Herzmuskelproben (humane Herzmuskelproben sowie Proben des linken Ventrikels von Mäusen) und konnte dabei ein signifikant gesteigertes Phosphorylierungslevel der PEVK-Region an Position Ser11878 nachweisen (Hopf et al., 2018). Vor dem Hintergrund der genannten Studie stellt sich die Frage, aus welchem Grund kardiales Titin im Falle eines Diabetes mellitus verstärkt phosphoryliert wird, wohingegen die Phosphorylierung am Titin der Skelettmuskulatur verringert ist. Auf Grund früherer Studien (Kötter et al., 2013; Kötter et al., 2016) ließ sich vermuten, dass das Phosphorylierungslevel die entstehende passive Spannung bei Dehnung der Muskelfaserproben beeinflussen könnte, weshalb die passive Spannung in Abhängigkeit vom Dehnungsgrad im weiteren Verlauf der Studie bei den einzelnen Versuchsgruppen bestimmt wurde.

In der aufgeführten Studie von Hopf et. al. wurde neben dem Phosphorylierungslevel der PEVK-Region in Kardiomyozyten ebenfalls die Aktivität der PKC α erhoben. Dabei wurde eine erhöhte Aktivität dieser Kinase unter diabetischer Stoffwechsellage festgestellt, welche wiederum für die Hyperphosphorylierung der kardialen PEVK-Region verantwortlich gemacht wurde (Hopf et al., 2018). Diese Ergebnisse aus der Versuchsreihe von Hopf et al. stehen im Einklang mit weiteren vorherigen Studienergebnissen. Zunächst zeigte die Studie Hidalgo et. al. aus dem Jahre 2009 bereits, dass die PEVK-Region des kardialen Titins maßgeblich als Angriffspunkt für die PKC α dient (Hidalgo et al., 2009). Bezüglich eines Einflusses der diabetischen Stoffwechsellage auf die PKC α -Aktivität, gab es ebenfalls weitere Hinweise aus früheren Studien. Die Studie von Gerald & King et al. postulierte beispielsweise die Hypothese, dass es bei gesteigertem Blutzuckerlevel zu einer erhöhten Diacylglycerol-Synthese kommt, welche wiederum die Aktivität verschiedener PKC-Isoformen steigert (Gerald & King, 2010). Bei den aufgeführten Studien handelt es sich um Studienmodelle an Kardiomyozyten, die die detektierte gesteigerte PKC α -Aktivität unter diabetischen Stoffwechsellage und die dadurch entstehende Hyperphosphorylierung in der kardialen Titin-PEVK-Region erklären. In der hier vorliegenden Studie, in der die Titin-PEVK-Region der Skelettmuskulatur untersucht wurde, kam es jedoch zu einer Hypophosphory-

lierung sowie einer lediglich leicht reduzierten Aktivität der PKC α unter diabetischer Stoffwechsellage. Das Ausbleiben der vermehrten Aktivierung der PKC α im Skelettmuskel erklärt dabei zwar die Tatsache, dass eine Hyperphosphorylierung der PEVK-Region ausbleibt, die jedoch nur marginal verminderte Aktivität der Kinase im Vergleich zur ermittelten Aktivität in den Kontrolltieren erklärt hingegen nicht, wie es zur signifikanten Hypophosphorylierung an Position Ser11878 und zu derselben Tendenz an Position Ser12022 kommt. Auch bleibt ungeklärt, wieso eine Steigerung der Aktivität der PKC α unter diabetischer Stoffwechsellage im Falle der Skelettmuskulatur überhaupt ausbleibt.

Eine zunächst naheliegende mögliche Erklärung für die Hypophosphorylierung der PEVK Region der Skelettmuskulatur erschien die Tatsache, dass neben der PKC α noch weitere PKC-Isoformen existieren (Olivier & Parker, 1992). Ein Beispiel hierfür stellt die PKC θ dar, die zu den Ca²⁺-unabhängigen Protein Kinasen C gehört (Hage-Sleiman, Hamze, Reslan, Kobeissy, & Dbaibo, 2015; Ringvold & Khalil, 2017; Salamanca & Khalil, 2005). Bisherige Studien zeigen das gehäufte Vorkommen und die Relevanz dieser PKC-Isoform im Skelettmuskel. Die Studien zeigen jedoch auch, dass die PKC θ -Aktivität unter diabetischer Stoffwechsellage, genau wie die bereits beschriebenen PKC α -Aktivität der Herzmuskelproben, signifikant gesteigert wird und es nicht zu der gesuchten Aktivitätsreduktion kommt (Itani, Pories, Macdonald, & Dohm, 2001). Außerdem konnte die Studie von Hidalgo et al. aus dem Jahre 2009 schließlich mit Hilfe von in vitro Phosphorylierung und Massenspektrometrie, die PEVK-Region als primäre PKC α Phosphorylierungsstelle identifizieren und den Einfluss weiterer PKC-Isoformen auf diese Region größtenteils ausschließen (Hidalgo et al., 2009). Demnach erscheinen weiterführende Untersuchungen bezüglich anderer relevanter PKC-Isoformen, um die detektierte Hypophosphorylierung zu erklären, im Folgenden als nicht sinnvoll. Aufschlussreich könnte hingegen die Untersuchung der Aktivität der Protein Phosphatase 1 (PP1) sein. Die PP1 ist für die Dephosphorylierung der PEVK-Region des Titinproteins verantwortlich (Hidalgo et al., 2009). Demnach könnte eine gesteigerte Aktivität unter diabetischer Stoffwechsellage eine mögliche Erklärung für die detektierte Hypophosphorylierung darstellen. Eine weitere mögliche Erklärung stellt die Relevanz einer ganz anderen Kinase bezüglich der Phosphorylierung der PEVK-Region des Titins der Skelettmuskulatur dar. Auf diese Möglichkeit wird im Unterpunkt 4.4 näher eingegangen.

4.2 Fehlende Veränderung der Titin-abhängigen passiven Spannung im Skelettmuskel durch einen Typ-2-Diabetes

Frühere Studien konnten zeigen, dass der Kardiomyozyt steifer wird bei Hyperphosphorylierung der PEVK-Region und eine gesteigerte passive Spannung bei Dehnung auftritt (Kötter et al., 2013; Kötter et al., 2016). Demnach würde man im Falle der diabetischen Proben der Skelettmuskulatur eine Reduktion der passiven Spannung vermuten auf Grund des detektierten verminderten Phosphorylierungslevels. Wie die vorliegende Studie jedoch zeigen konnte, tritt trotz unterschiedlichem Phosphorylierungslevel bei den diabetischen und nicht-diabetischen Skelettmuskelproben keine veränderte passive Spannung auf. Bezüglich der diabetischen Versuchspalten ergab die Auswertung der Western Blot Analyse wie bereits beschrieben ein signifikant vermindertes Phosphorylierungslevel der PEVK-Region im Vergleich mit den nicht-diabetischen Proben. Dennoch konnte kein Unterschied

bezüglich der passiven Spannung zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert werden. Setzt man die ermittelten Werte der db/db sham - Versuchstiere in Vergleich mit den db/+ sham - Tieren, zeigen sich nahezu identische Werte bezüglich der passiven Spannung. Postischämisch steigt die passive Spannung in beiden Versuchsgruppen, diabetisch und nicht-diabetisch, nahezu in gleichem Maße an. Nun bleibt die Frage, wie die passive Spannung im Falle der diabetischen Versuchstiere, trotz eines signifikant verminderten Phosphorylierungsstatus der PEVK-Region, auf einem Level, mit dem der nicht-diabetischen Kontrolltiere gehalten werden kann. Eine Möglichkeit wäre, dass das Phosphorylierungslevel am Serinrest Ser11878 einen anderen Einfluss auf die Funktion der Skelettmuskulatur hat als bei Kardiomyozyten und die passive Spannung im Skelettmuskel durch ein modifiziertes Phosphorylierungslevel nicht beeinflusst wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Phosphorylierung zwar einen Einfluss auf die passive Spannung im Skelettmuskel hat, es aber gleichzeitig zu weiteren Modifikationen kommt die ebenfalls Einfluss nehmen. Genauer gesagt, könnte es sekundäre Kompensationsmechanismen geben, die die herabgesetzte passive Spannung durch eine Hypophosphorylierung wieder kompensieren und im vorliegenden Versuchsaufbau nicht analysiert wurden. Möglicherweise könnte eine nähere Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress weitere Erkenntnisse bezüglich ebenfalls relevanter Modifikationen bezogen auf die entstehende passive Spannung erbringen. Frühere Studien haben bereits ein erhöhtes oxidatives Stresslevel bei Diabetespatienten festgestellt (Rehman & Akash, 2017). In der vorliegenden Studie wurde dieser Nachweis bisher noch nicht erbracht. Die Messung und Quantifizierung von oxidativem Stress ist dabei durch die Verwendung verschiedener Biomarker möglich (Edwin Hoa, 31 July 2013). Da viele dieser Biomarker jedoch instabil und schwer messbar sind, könnte man auch auf den Nachweis von gesteigerter Lipid-Peroxidation zurückgreifen. Eine erhöhte Peroxidation von Fetten entsteht durch freie Radikale und bedingt unter anderem die mikro- und makrovaskulären Komplikationen bei Diabetes Mellitus Patienten (Gasparovic, Jaganjac, Mihaljevic, Sunjic, & Zarkovic, 2013; Rehman & Akash, 2017). Die bisher detektierten Modifikationen des Titinproteins auf Grund eines gesteigerten oxidativen Stresslevels resultieren dabei zum größten Teil in einer Verminderung der passiven Spannung. Dazu zählen die S-Gluthathionylisierung innerhalb der Ig-Domäne oder der genetischen Funktionsverlust der Arginyltransferase (ATE1), die für die Arginylierung der A-Bande zuständig ist. Beide Modifikationen führen zu einer Entfaltung und einem Stabilitätsverlust des Proteins, und damit zu einer verminderten passiven Spannung (Alegre-Cebollada et al., 2014; Grutzner et al., 2009; Leite et al., 2016). Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Studie wird jedoch nach einer Modifikation innerhalb der diabetischen Proben gesucht, die zu einer Steigerung der passiven Spannung führt, und diese damit auf einem Level der passiven Spannung der nicht-diabetischen Proben trotz vermindertem Phosphorylierungslevel der PEVK-Region hält. Bisherige Studien zeigen dabei, dass eine solche Steigerung bei erhöhtem oxidativen Stresslevel durch Disulfidbrückenbildung innerhalb der N2B-Region des kardialen Titins zustande kommt (Grutzner et al., 2009). Die N2B-Region des kardialen Titins ist dabei nicht im skelettalen Titin vorhanden, dieses enthält lediglich die N2A-Domäne. Da die N2A-Region jedoch nicht zu den elastischen Eigenschaften des Titins der Skelettmuskulatur beiträgt, sondern diese auf der Ig-Domäne sowie der PEVK-Region beruhen, wäre vielmehr eine weiterführende Untersuchung bezüglich möglicher Disulfidbrückenbildungen innerhalb der PEVK-Region und der Ig-Domäne gegebenenfalls zielführend (Linke et al., 1996; Linke & Kruger, 2010).

Ein weiterer möglicher Einfluss von oxidativem Stress auf die passive Spannung der Skelettmuskulatur könnte die Intermediärfilamente betreffen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigte sich, dass oxidativer Stress zu posttranslationalen Modifikationen von Intermediärfilamenten, wie zum Beispiel Desmin, führt. Dabei kommt es zu einer Veränderung des menschlichen Desmins durch Hyperphosphorylierung oder durch gesteigerte Proteolyse, wodurch sich das molekulare Gewicht des Desmins verändern kann (Delort et al., 2019). Da ca. 10% der passiven Spannung auf den Intermediärfilamenten beruht, könnte eine Modifikation dieser Filamente möglicherweise ebenfalls in einer gesteigerten passiven Spannung der Muskelfasern resultieren (Granzier & Irving, 1995; Granzier & Wang, 1993b).

Des Weiteren könnten bisher noch nicht detektierte Phosphorylierungsstellen innerhalb der Ig-Domäne sowie der PEVK-Region des skelettalen Titins Einfluss auf die passive Spannung haben. Am Herzen sind bereits multiple Positionen in der N2B-Region bekannt, die bei verminderter Phosphorylierung zu einer gesteigerten passiven Spannung beitragen. Besonders im Vordergrund stehen dabei die Positionen Ser4099 (PKG) sowie Ser4010 (ERK 1/2) in den Kardiomyozyten (Hopf et al., 2018). Der Isoformen-Wechsel, der im kardialen Titin außerdem noch Einfluss auf die passive Spannung hat, ist im Skelettmuskel ausgeschlossen. Im Skelettmuskel existiert lediglich eine Isoform (N2A-Isoform), während im kardialen Titin zwei Isoformen (N2A und N2B) vorkommen, welche den Wechsel überhaupt erst ermöglichen (Krüger & Kötter, 2016).

4.3 Ischämische Modulation des Phosphorylierungsstatus der PEVK-Region und sein Einfluss auf die Veränderung der Titin-abhängigen passiven Spannung der Skelettmuskulatur

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es kurz nach einem akuten Myokardinfarkt (60-minütiger Ischämie und anschließender 24-stündiger Reperfusion) zu einer Modifikation der PEVK-Region des Titins in der Psoasmuskulatur kommt. Zwar konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden, jedoch ist vor allen Dingen an der Position Ser11878 der PEVK-Region deutlich die Tendenz einer gesteigerten Phosphorylierung zu erkennen.

Bei der Untersuchung des Phosphorylierungslevels der PEVK-Region an Position Ser12022 zeigte sich bereits die Tendenz einer I/R-induzierten gesteigerten Phosphorylierung. An der Position Ser11878 der Skelettmuskulatur ergab der Vergleich der db/+ sham-Gruppe zur db/+ I/R-Gruppe einen P-Wert von 0.08. Da die vorliegenden Einzelwerte der db/+ I/R-Versuchstiere an Position Ser11878 eine hohe Streuung aufweisen, könnte mit einer Steigerung der n-Zahl möglicherweise ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Diese gesteigerte Phosphorylierungstendenz passt auch zu kürzlich durchgeführten Versuchen unserer Arbeitsgruppe (unpublished data). Es wurde dabei die Herzmuskulatur derselben Mäuse untersucht, die auch als Versuchstiere der vorliegenden Studie dienten. Demnach unterlagen die Proben derselben Ischämie- und Reperfusionszeit vor Entnahme. Bei den Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des kardialen Titins an Position Ser11878 der db/+ sham- im Vergleich zur db/+ I/R-Gruppe konnte dabei im Remote Bereich des Myokards (Nicht-ischämisches Myokardgebiet) eine statistisch signifi-

kante Steigerung der Phosphorylierung der I/R-Gruppe festgestellt werden. Diese signifikante Hyperphosphorylierung geht einher mit einer ebenfalls signifikant gesteigerten passiven Spannung nach I/R bei den db/+ Mäusen (unpublished data). Der Umstand, dass das Remote-Gebiet des Herzens, also das Gewebe, das das ischämische Myokard umgibt, von diesen Modifikationen betroffen ist, warf die Frage auf, ob es sich um eine systemische Veränderung handeln könnte und folglich auch die periphere Skelettmuskulatur betrifft. Diese Vermutung stellte unter anderem den Anlass für die vorliegende Studie dar. Neben der Erhebung des Phosphorylierungsstatus der PEVK-Region erfolgte im Zuge der vorliegenden Studie demnach ebenfalls die Messung der entstehenden passiven Spannung bei Dehnung der Skelettmuskelproben. Es konnte gezeigt werden, dass es zwar zu keinem signifikanten, dennoch aber deutlich erkennbaren Anstieg der passiven Spannung im Falle der Versuchstiere mit induzierter I/R (db/+ I/R, db/db I/R) im Vergleich mit ihrer jeweiligen sham-Tiergruppe (db/+ sham, db/db sham) kommt. Frühere Studien an kardialen Titin zeigen dabei bereits, dass die Hyperphosphorylierung der PEVK-Region unter anderem verantwortlich für eine gesteigerte passive Spannung der Kardiomyozyten ist (Kötter et al., 2013; Kötter et al., 2016). Ob jedoch die in der vorliegenden Studie erhobene Hyperphosphorylierung der PEVK-Region die (alleinige) Ursache der detektierten gesteigerten passiven Spannung im Falle der I/R-Versuchstiere im Vergleich mit ihren sham-Gruppen darstellt, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden.

Der Anstieg der Phosphorylierung der I/R-Tiergruppen bezieht sich jeweils auf ihre Sham-Tiergruppen (db/+ I/R bezogen auf db/+ sham; db/db I/R bezogen auf db/db sham). Vergleicht man diese Ergebnisse miteinander, lässt sich eine Korrelation zwischen dem erhöhten Phosphorylierungsstatus und der gesteigerten passiven Spannung im Falle der I/R-Proben vermuten. Vergleicht man jedoch beispielsweise die Phosphorylierung der db/db I/R-Proben mit den db/+ I/R-Proben, zeigt sich, dass das Phosphorylierungslevel der diabetischen Proben zwar deutlich unterhalb des Levels der nicht-diabetischen Proben liegt, die Entwicklung der passiven Spannung jedoch nahezu identisch ist. Insgesamt stehen der vermuteten Korrelation die Untersuchungsergebnisse der diabetischen Versuchstiergruppe gegenüber, welche dem Zusammenhang zwischen Phosphorylierungsstatus und passiver Spannung zu widersprechen scheinen. Folglich stellt sich die Frage, ob die Steigerung der passiven Spannung in den ischämischen Proben des Titins der Skelettmuskulatur nicht unabhängig von dem erhobenen Phosphorylierungsstatus ist und durch eine andere Modifikation beeinflusst wird. Dieser Überlegung gegenüber stehen die Ergebnisse der Studie Kötter et. al, welche die Erhöhung der passiven Spannung am Herzen nach Myokardinfarkt auf ein gesteigertes Phosphorylierungslevel der PEVK-Region des kardialen Titins zurückführen konnte (Kötter et al., 2016). Eine Kombination aus der Modulation der passiven Spannung durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus sowie weiterer, noch nicht erforschter Beeinflussungen durch die diabetische Stoffwechsellage und möglicherweise auch postischämisch, erscheint damit am naheliegendsten, um die vorliegenden Ergebnisse zu erklären. Weitere Untersuchungen, um eine schlussendliche Aussage bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Phosphorylierungsstatus der PEVK-Region und der damit verbundenen Beeinflussung der passiven Spannung treffen zu können, sind in jedem Fall notwendig. Erste weiterführende Untersuchungen könnten im Nachweis einer, bzw. keiner, statistischen Signifikanz der Steigerung der passiven Spannung im Falle der postischämischen Proben bestehen. Dieser Nachweis steht, wie bereits oben besprochen, auch

noch für das gesteigerten Phosphorylierungslevels der PEVK-Region der postischämischen Proben aus. Äquivalent zu den Daten des Phosphorylierungslevels weisen auch die Einzelwerte der passiven Spannung der I/R-Proben eine große Streuung auf. Eine Erhöhung der n-Zahl der Tierproben dieser Versuchsgruppe und eine weitere Datenerhebung erscheint damit allgemein für diese Versuchsgruppe als sinnvoll. Um einen genaueren Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungslevel der PEVK-Region des skelettalen Titins und der passiven Spannung herstellen zu können, könnte das Identifizieren der verantwortlichen Kinase für die Phosphorylierung der untersuchten Positionen von Vorteil sein. Können die Positionen Ser11878 und Ser12022 als eindeutige Modifikationspunkte einer bestimmten Kinase der Skelettmuskulatur zugeordnet werden, kann mit Hilfe einer Veränderung der Kinasenaktivität (Blockierung und Aktivierung) und dem damit korrelierenden Phosphorylierungsstatus, die genaue Beeinflussung des Phosphorylierungslevels auf die passive Spannung weiter untersucht werden. Ein weiterer möglicher Modulationspunkt, über den die Veränderung der passiven Spannung genauer untersucht werden könnte, stellt die Veränderung des IL-6-Konzentrationslevels dar. Vereinzelt Studien zeigen einen Einfluss der IL-6-Konzentration auf das Phosphorylierungslevel im kardialen Titin (Kötter et al., 2016). Falls dieser Umstand auch für das skelettale Titin nachgewiesen werden kann, könnte eine kontrollierte Veränderung des Konzentrationslevels des Zytokins IL-6 und eine gleichzeitige Detektion der passiven Spannung weitere Erkenntnisse erbringen. Mehr dazu im Unterpunkt 4.4.

4.3.1 Möglicher physiologischer Vorteil der I/R-Skelettmuskelproben auf Grund der detektierten gesteigerten passiven Spannung

Weiterhin ungeklärt ist bisher, welche Funktion eine gesteigerte passive Spannung in der Skelettmuskulatur postischämisch einnehmen könnte. Die Studie Kötter et al. (2016) weist darauf hin, dass die erhöhte Steifigkeit postischämisch im Remote-Areal des Herzens für das Aufrechterhalten der Herzfunktion von essentieller Bedeutung ist. Insgesamt soll das modulierte Titin eine erhöhte Stabilität mit sich bringen, besonders in Phasen der gesteigerten An- und Entspannungsrate. Allerdings führt eine erhöhte passive Spannung laut Studie auf Dauer auch zu einer erhöhten mechanischen Belastung, die langfristig Sarkomerschäden mit sich bringen kann (Kötter et al., 2016). Um eine Aussage über den Einfluss einer veränderten passiven Spannung auf die kontraktile Skelettmuskelfunktion zu machen, könnte die Erhebung der längenabhängigen aktiven Kraftmessung weiterhelfen. Bei der längenabhängigen aktiven Kraftmessung wird zunächst die relaxierte Muskelfaser in kalziumhaltige Aktivierungslösung gelegt und die dabei entstehende Maximalkraft detektiert. Anschließend wird dieselbe Muskelfaser passiv um einen bestimmten Prozentsatz ihrer Ausgangslänge vorgedehnt und der Vorgang wiederholt. In Kardiomyozyten konnte bereits gezeigt werden, dass ein steiferes Titin die längenabhängige Aktivierung unterstützt (Cazorla, Wu, Irving, & Granzier, 2001). Würde ein steiferes Titin im Skelettmuskel ebenfalls zu einer gesteigerten längenabhängigen Aktivierung führen, könnte dies einen physiologischen Vorteil für die möglicherweise durch die Ischämie oder Reperfusion geschädigte Skelettmuskulatur der I/R-Versuchstiere darstellen (Musaro et al., 2010). Bezüglich der aktiven Kraftentwicklung der Skelettmuskulatur postischämisch liegen zurzeit lediglich Erkenntnisse einer längerfristigen Entwicklung vor. Genauer gesagt, wurde in einer Studie aus dem Jahre

1998 die aktive Kraftentwicklung der Skelettmuskulatur von Ratten 12 Wochen postischämisch untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Verringerung der Kraftentwicklung sowie der An- und Entspannungs-Rate in der Skelettmuskulatur der Versuchstiere kommt (Williams & Ward, 1998). Dies scheint zunächst der vermuteten gesteigerten aktiven Kraftentwicklung auf Grund der erhöhten passiven Spannung der vorliegenden Proben gegenüber zu stehen. Es bleibt jedoch zu beachten, dass die untersuchten Skelettmuskelproben der vorliegenden Studie bereits 24 Stunden nach Ischämie entnommen wurden und dass es 12 Wochen postischämisch bereits zu sekundären Anpassungsreaktionen am Skelettmuskel gekommen sein könnte, die bei den hier untersuchten Muskelproben noch nicht vorhanden sind. Am Herzen zeigt sich beispielsweise eine anfänglich erhöhte passive Spannung, welche nach einigen Tagen wieder deutlich abfällt (Kötter et al., 2016). Der Abfall der Spannung korreliert dabei mit dem Abfall des Phosphorylierungslevels innerhalb der PEVK-Region. Die noch verbleibende Erhöhung der passiven Spannung im Vergleich zum Ausgangswert, ist auf die Ausbildung einer Kollagennarbe zurückzuführen, die im Verlauf die Rolle der Stabilisierung des Myokards übernimmt (Kötter et al., 2016). Neben der Erhebung der längenabhängigen Kraftentwicklung 24 Stunden postischämisch, könnte also auch die Untersuchung der langfristigen Gewebeveränderung von Interesse sein, um weitere mögliche Anpassungsreaktionen, die Einfluss auf die passive Spannung und aktive Kraftentwicklung haben, zu detektieren.

Um den möglichen Einfluss der veränderten passiven Spannung auf die aktive Kraftentwicklung schlussendlich als Kompensationsmechanismus bzw. als physiologischen Vorteil des Gewebes zu bezeichnen, müsste vorerst die vermutete Schädigung des Gewebes nach Ischämie nachgewiesen werden, welche einer Kompensation bedarf. Einen ersten Hinweis auf eine Infarkt-induzierte Schädigung der Skelettmuskulatur in Form eines vermehrten Abbaus des Muskelgewebes postischämisch schien zunächst die Studie von Ali et al. 2010 zu liefern. Die Studie postuliert, dass die auf einen akuten Myokardinfarkt folgende Muskelschwäche am Herzen auf den vermehrten Abbau des Titinproteins durch die Matrix Metalloproteinasen-2 (MMP-2) zurückzuführen ist. Die MMP-2 soll dabei vermehrt in der Z-Bande in der Nähe des Titinproteins angeordnet sein und dort nach induzierter Myokardischämie und anschließender Reperfusion das Titin proteolytisch abbauen. Ein Nachweis dafür soll unter anderem das Auftreten der charakteristischen Titin-Degradationsbande (T2) in der Gelelektrophorese sein (Ali et al., 2010). Im Zuge der vorliegenden Studie zeigte sich bei den Titin-Analysen mittels Gelelektrophorese die genannte Degradationsbande. Diese wurde jedoch nicht densitometrisch analysiert, weshalb eine schlussendliche Aussage über ein verstärktes Auftreten bei den Proben mit induzierter Ischämie nicht möglich ist. Eine zukünftige Analyse der T2-Bande könnte also eine Möglichkeit darstellen einen Hinweis auf eine eingeschränkte Funktionalität des Gewebes zu erhalten. Es ist dabei allerdings zu beachten, dass das erhöhte oxidative Stresslevel welches während eines akuten Myokardinfarktes auftritt, das Gewebe vermehrt strapaziert und es zu einem erhöhten Gewebeumbau kommt, welcher ebenfalls zu einem gehäuftem Auftreten von Degradationsbanden führen kann (Frangogiannis, 2014; Hein et al., 1994; Helmes, Trombitas, & Granzier, 1996; Kötter et al., 2016; Krüger & Kötter, 2016). Demnach wäre selbst nach Quantifizierung des vermehrten Auftretens einer Degradationsbande im Falle der ischämischen Skelettmuskelproben diese nicht automatisch auf einen gesteigerten Abbau zurückzuführen, sondern könnte lediglich auch auf unspezifische Umbauprozesse hinweisen. Des

Weiteren ist zu beachten, dass es zu einer Schädigung des Gewebes im Zuge der Proben-gewinnung und/oder Probenaufarbeitung kommen kann, welche ebenfalls zum Auftreten einer Degradationsbande führen kann. Einen letzten Zusammenhang zwischen dem gesteigerten Auftreten einer Degradationsbande und der Funktionalität des Gewebes herzustellen, müsste in jedem Fall kritisch betrachtet werden. Weitere Erkenntnisse bezüglich einer Schädigung der Skelettmuskulatur postischämisch könnte weiterführend möglicherweise der Nachweis eines gesteigerten oxidativen Stresslevels und/oder der Nachweis eines Reperfusionssyndroms liefern (siehe Unterpunkt 4.3.2).

4.3.2 Weiterführende Untersuchungen bezüglich eines postischämisch gesteigerten oxidativen Stresslevels und seinem Einfluss auf die Skelettmuskulatur

Es wurde bereits erläutert, dass eine Untersuchung bezüglich eines erhöhten oxidativen Stresslevels in der Skelettmuskulatur bei diabetischer Stoffwechsellage sinnvoll wäre und welche Untersuchungsmöglichkeiten es gibt. Diese Untersuchungen erscheinen vor dem folgenden Hintergrund auch im Rahmen der postischämischen Proben als sinnvoll. Zunächst könnten sich möglicherweise weitere Erkenntnisse bezüglich einer Schädigung der Skelettmuskulatur postischämisch daraus ergeben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es zu einer Veränderung der Skelettmuskulatur nach einem akuten Myokardinfarkt auf Grund eines erhöhten oxidativen Stresslevels und freiwerdender Entzündungsmediatoren kommt (Jordan et al., 1999). Ein kurzzeitiger Einfluss von freien Radikalen auf den Skelettmuskel regt dabei regenerative Prozesse an, wohingegen ein längeres und unkontrolliert erhöhtes oxidatives Stresslevel zu pathologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur führt. Welche Art von Veränderungen sich hierbei ergeben, konnte bisher noch nicht spezifiziert werden (Musaro et al., 2010). Des Weiteren könnte es neben einer Schädigung des Skelettmuskelgewebes, wie bereits im Falle einer diabetischen Stoffwechsellage diskutiert, auch zu einer direkten Modifikation der passiven Spannung durch frei werdende Sauerstoffradikale kommen (Frangogiannis, 2014). Titin wird bei erhöhtem oxidativen Stresslevel durch S-Glutathionylierung, S-Nitrosylierung und durch Disulfidbrückenbildung modifiziert. Dabei führt eine S-Glutathionylierung beispielsweise zu einer Senkung und die Disulfidbrückenbildung zu einer Steigerung der passiven Spannung, wie sie auch in der vorliegenden Studie bei den I/R-Versuchstieren detektiert werden konnte (Alegre-Cebollada et al., 2014; Figueiredo-Freitas et al., 2015; Grutzner et al., 2009). Auch konnte eine Modifikation von Kinasen durch ein verändertes oxidatives Stresslevel nachgewiesen werden (Boerrigter et al., 2007). Eine mögliche relevante Beeinflussung und basale Änderung des Gewebes durch freie Sauerstoffradikale, auch bezüglich des erhobenen Phosphorylierungslevels und der detektierten passiven Spannung, muss folglich in Betracht gezogen und zukünftig noch geprüft werden. Eine Besonderheit stellt zuletzt das ebenfalls durch freie Sauerstoffradikale bedingte Reperfusionssyndrom dar. Allein auf Grund der induzierten Ischämiezeit von 60 Minuten, unbeachtet zunächst der anschließenden 24-stündigen Reperfusionszeit, kommt es vermutlich nicht zu einem Absterben der Skelettmuskulatur. Eine frühere Studie konnte erst nach drei Stunden reiner Ischämiezeit ein irreversibles Absterben von Gewebearealen nachweisen (Blaisdell, 2002). Demnach liegt zunächst die Vermutung nahe, dass die untersuchten Skelettmuskelproben keine abgestorbenen Gewebeareale enthalten, und damit weiterhin der gesamte Skelettmuskel gleichmäßig bei mechanischer Belastung beansprucht wird. Kommt es jedoch zum sog. Reperfusionssyndrom, hängt eine Schädigung

des Gewebes nicht mehr von der induzierten Ischämiezeit ab. Ein Reperfusionssyndrom entsteht auf Grund der Bildung freier Sauerstoffradikale, und dem dadurch bedingten Einwandern von Neutrophilen Granulozyten nach Wiedereinsetzen der Durchblutung. Die damit einhergehende Entzündungsreaktion greift das bereits durch die Ischämie vorgeschädigte Muskelgewebe stark an. Es kommt zu einer gesteigerten Permeabilität des Gewebes sowie der umliegenden Gefäße und zur folgenden Ödembildung innerhalb des Gewebes, was wiederum eine erneute Verschlechterung der Durchblutung hervorruft (Carden & Granger, 2000). Infolge dieser Schädigung könnte es also zu einer Reduktion des funktionalen Muskelgewebes kommen, wodurch das restliche Gewebe einer erhöhten mechanischen Belastung ausgesetzt wäre. Eine mechanische Überbelastung könnte wiederum zu sekundären Anpassungsreaktionen wie einer Hypertrophie der Muskulatur führen (Yamazaki, Komuro, & Yazaki, 1995), die auch Einfluss auf die passive Spannung des Muskelgewebes nehmen könnten. In der vorliegenden Studie erfolgte nach der 60-minütigen Ischämie eine Reperfusion des Gewebes von 24 Stunden, die Entstehung eines Reperfusionssyndrom wäre demnach möglich. Die Skelettmuskelproben wurden jedoch nicht auf die Folgen eines Reperfusionssyndrom hin untersucht. Es wäre demnach sinnvoll in einer weiterführenden Studie die Proben auf Ödeme, Schwellungen oder eingewanderte Granulozyten hin zu untersuchen.

4.4 Einfluss der PKC α sowie möglicher anderer Kinasen auf die Phosphorylierung der PEVK-Region des skelettalen Titins und ihre Beeinflussung durch eine veränderte Zytokin-IL6-Konzentration

Um die Aktivität der PKC α zu bestimmen, wurde das relative Phosphorylierungslevel des Aktivierungsloops an der Stelle T497 bestimmt. Im Falle der diabetischen Versuchstiere zeigten die erhobenen Werte lediglich eine sehr geringe Verminderung der Kinaseaktivität im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrolltieren. Diese nur marginal verminderte Aktivität kann, wie bereits im Unterpunkt 4.1 diskutiert, nicht für das statistisch signifikant verringerte Phosphorylierungslevel an Position Ser11878 der PEVK-Region der diabetischen Versuchstiere bezogen auf ihre nicht-diabetischen Kontrollgruppen verantwortlich gemacht werden. Im Falle der ischämischen im Vergleich mit den nicht-ischämischen Versuchstierproben könnte die nachgewiesene Veränderung der Aktivität der PKC α hingegen für die Hyperphosphorylierung der PEVK-Region der I/R-Versuchstiere verantwortlich sein. Bei großer Streuung der gemessenen Einzelwerte der PKC α -Aktivität im Falle der I/R-Proben könnte eine Erhöhung der n-Zahl der Tierproben neue Erkenntnisse bzgl. einer signifikanten Veränderung erbringen. Des Weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass eine veränderte Kinase-Aktivität im skelettalen Titin möglicherweise nicht genauso wie im Titin der Kardiomyozyten nachgewiesen werden kann. Genauer gesagt, besteht die Möglichkeit, dass die PKC α -Aktivität zwar signifikant erhöht ist, aber im Skelettmuskel nicht mit dem relativen Phosphorylierungslevel des Aktivierungsloops der PKC α an der Stelle T497 ermittelt werden kann. In der vorliegenden Studie wurde die PKC α -Aktivität überprüft, da sie im kardialen Titin nachweislich die Positionen Ser11878 und Ser12022 der PEVK-Region phosphoryliert (Hidalgo et al., 2009). Des Weiteren konnten frühere Studien bereits einen Anstieg der PKC α -Aktivität sowohl im Titin von I/R-Mäuseherzen (20 Minuten Ischämie/60

Minuten Reperfusion) als auch in Kardiomyozyten von diabetischen Patienten detektieren (Hopf et al., 2018; Kötter et al., 2016). Ausgehend davon, dass eine Aktivitätsveränderung der PKC α im skelettalen Titin gleichermaßen nachgewiesen werden kann wie im kardialen Titin, kann anhand der vorliegenden Studie eine Relevanz der Kinase im Falle eines Diabetes mellitus bzgl. der untersuchten Phosphorylierungsstellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Neben der bereits diskutierten Möglichkeit einer Hypophosphorylierung bei gesteigerter PP1-Aktivität (Hidalgo et al., 2009), wird im Folgenden die mögliche Relevanz einer anderen Kinase als der PKC α , mit verminderter Aktivität bei diabetischer Stoffwechsellage, diskutiert. Lässt sich zukünftig auch keine statistische Signifikanz bezüglich der Steigerung der PKC α -Aktivität in den I/R-Versuchsgruppen feststellen, muss auch hier die mögliche Relevanz einer anderen Kinase oder einer anderen posttranslationalen Modifikation im Titin der Skelettmuskulatur in Betracht gezogen und untersucht werden.

Für die im skelettalen Titin enthaltene PEVK-Region konnte bisher neben der PKC α noch die CaMKII δ als modifizierende Kinase identifiziert werden (Hidalgo & Granzier, 2013; Kötter et al., 2016). Da für die anderen im Folgenden aufgeführten Kinasen bisher lediglich Phosphorylierungsstellen in Bereichen des Titinproteins gefunden werden konnten, die ausschließlich in den kardialen Isoformen vertreten sind, sollte der CaMKII δ -Aktivität im Skelettmuskel in weiterführenden Untersuchungen besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Hinzu kommt, dass die CaMKII δ in früheren Studien mit Kardiomyozyten von I/R-Versuchstieren eine gesteigerte Aktivität aufwies (Vila-Petroff et al., 2007). Da die vorliegenden Studienergebnisse eine Hyperphosphorylierung bei den postischämischen Gewebeproben feststellen konnten, wird folglich nach einer solchen gesteigerten Kinase-Aktivität gesucht. Die Tatsache, dass andere in Betracht kommende Kinasen, wie der PKG, PKA und der ERK1/2, bisher ausschließlich eine verminderte Aktivität postischämisch zeigten, rückt die CaMKII δ im Falle der I/R-Proben noch weiter in den Vordergrund (Kötter et al., 2016). Zu beachten ist, dass bisherige Studien, die eine gesteigerte Phosphorylierung der PEVK-Region auf die CaMKII δ zurückführen konnten, mit einer verminderten Titin-abhängigen passiven Spannung einhergingen (Hamdani, Krysiak, et al., 2013). Folglich wird in der Studie Kötter et al., in der die detektierte erhöhte passive Spannung der I/R-Versuchstiere auf das gesteigerte Phosphorylierungslevel zurückgeführt wird, die CaMKII δ als möglicher Modulator eher ausgeschlossen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die CaMKII δ innerhalb der Skelettmuskulatur Positionen des Titins modifiziert, welche im kardialen Titin durch die PKC α beeinflusst werden. Demnach kann die Wirkung einer gesteigerten CaMKII δ -Aktivität auf die passive Spannung innerhalb des skelettalen Titin anders als im Titin der Kardiomyozyten ausfallen und möglicherweise mit einer erhöhten passiven Spannung einhergehen. Weitere Kinasen, die bisher mit der Phosphorylierung des Titinproteins der Kardiomyozyten in Zusammenhang gebracht werden konnten, sind die ERK1/2 sowie die PKA und die PKG (Hidalgo & Granzier, 2013; Krüger & Linke, 2009; Raskin et al., 2012). Frühere Studien zeigen bisher ausschließlich eine Modifikation der Phosphorylierung der N2B-Region des kardialen Titins durch diese drei Kinasen (Hidalgo & Granzier, 2013). Die N2B-Region ist im Titin der Skelettmuskulatur jedoch nicht vorhanden, was eine Beeinflussung innerhalb derselben Region folglich ausschließt. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass es an anderer Stelle des skelettalen Titinproteins, wie z.B. der PEVK-Region oder innerhalb der Ig-Domäne, zu einer Modifikation durch die aufgeführten Kinasen kommt. Studien, die sich mit der Aktivität der genannten Kinasen innerhalb der Skelettmuskulatur beschäftigen, stehen bisher nicht im Zusammenhang mit dem Titinprotein. Unabhängig vom

Titinprotein, scheinen die ERK1/2 und die PKA jedoch eine besonders wichtige Rolle in den Signalkaskaden der Skelettmuskulatur einzunehmen. Sie sind seit Jahren Thema der Skelettmuskulaturforschung (Hwang et al., 2013; Ortmeyer, 1997; Reiken et al., 2003; Silveira et al., 2014; Vary, Deiter, & Lang, 2004). Zur PKG existieren bezüglich der Skelettmuskulatur bisher hingegen nur vereinzelte Studien (Young & Leighton, 1998). Bezüglich der ERK1/2-, der PKA- und der PKG-Aktivität liegen außerdem Studien vor, die sich mit der Veränderung ihrer Aktivität unter diabetischer Stoffwechsellaage beschäftigen. Die Untersuchungen wurden bisher ausschließlich mit kardialen Titinproben durchgeführt und nicht mit Skelettmuskelproben. Dabei konnte eine verminderte Aktivität der ERK 1/2 sowie der PKG in den diabetischen verglichen mit den nicht-diabetischen Proben nachgewiesen werden, die zu einer Hypophosphorylierung der N2B-Region an den Stellen S4099 (PKG) und S4010 (ERK1/2) führten (Hopf et al., 2018). Bezüglich der PKA-Aktivität liegen unterschiedliche Erkenntnisse vor. Laut der Studie Hopf et al. aus dem Jahre 2018 blieb die PKA-Aktivität unbeeinflusst von der diabetischen Stoffwechsellaage (Hopf et al., 2018). Dagegen zeigte eine Studie aus dem Jahre 1997 in der Skelettmuskulatur von Affen mit Diabetes mellitus ein geringeres basales Aktivitätslevel der PKA im Vergleich mit den nicht-diabetischen Versuchstieren (Ortmeyer, 1997). Außerdem liegen bezüglich der PKA bereits Hinweise darauf vor, dass spezifische Phosphorylierungsstellen nicht nur innerhalb des kardialen, sondern auch des skelettalen Titins existieren. Im kardialen Titin konnte der PKA, wie bereits erwähnt, eine Phosphorylierungsstelle innerhalb der N2B-Region zugeordnet werden, welche im Titin der Skelettmuskulatur fehlt. Gleichzeitig konnte trotzdem eine Beeinflussung des Phosphorylierungslevels des skelettalen Titinproteins durch die PKA nachgewiesen werden (Krüger, Kohl, & Linke, 2006). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass weitere spezifische Phosphorylierungsstellen der PKA außerhalb der N2B-Region, zum Beispiel innerhalb der Ig-Domäne, existieren. Ob diese Phosphorylierungsstellen jedoch zu den genannten Modifikationen beitragen, müsste weiterführend untersucht werden.

Zusammengefasst scheinen die genannten Kinasen zum einen eine Rolle innerhalb der Skelettmuskulatur zu spielen und zum anderen durch eine diabetische Stoffwechsellaage (PKA, PKG, ERK1/2) oder nach akutem Myokardinfarkt (CaMKII δ) beeinflusst zu werden. Unter Berücksichtigung dieser Studien könnte demnach auch eine Aktivitätsänderung der aufgeführten Kinasen und eine dadurch bedingte Modifikation des skelettalen Titinproteins unter diabetischer Stoffwechsellaage und/oder postischämisch vorliegen. Das Vorliegen einer Aktivitätsverminderung einer der Kinasen könnte beispielsweise einen Hinweis darauf geben, wie es zu dem detektierten signifikant verminderten Phosphorylierungslevel innerhalb der PEVK-Region der diabetischen verglichen mit den nicht-diabetischen Skelettmuskelproben kommt. Eine Aktivitätssteigerung postischämisch wäre wiederum ein Hinweis auf eine weitere relevante Kinase die für die Hyperphosphorylierung der I/R-Proben mit verantwortlich sein könnte. Um zunächst überhaupt eine mögliche Beeinflussung der genannten Kinasen auf die untersuchten Phosphorylierungsstellen (Ser118787 und Ser12022) der PEVK-Region zu detektieren, könnten jeweils spezifische Kinaseinhibitoren eingesetzt werden und im Zusammenhang damit die Veränderung des Phosphorylierungslevels dieser Positionen untersucht werden. Alternativ dazu wäre noch die erneute Durchführung einer Massenspektrometrie möglich, um weitere Phosphorylierungsstellen nach Kinasebehandlung nachzuweisen. Auch muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das Zusammenspiel verschiedener Kinasen zu dem vorliegenden Ergebnis

geführt haben könnte und dass unterschiedliche Kinasen oder eine andere posttranslationale Modifikation im Falle eines akuten Myokardinfarktes und unter diabetischer Stoffwechsellage eine Rolle im Titin der Skelettmuskulatur spielen.

Eine zusätzliche Herangehensweise für weiterführende Untersuchungen bezüglich der vorliegenden Studie könnte außerdem noch die Untersuchung der IL-6-Konzentration und dessen Einfluss auf das Phosphorylierungslevel der PEVK-Region bieten. In vorrangegangenen Studien im Zusammenhang mit kardialen Titin konnte festgestellt werden, dass die nachgewiesene gesteigerte Aktivität der PKC α eng mit der Konzentration des IL-6-Zytokins zusammenhängt (Kötter et al., 2016). Da auch im Skelettmuskel das Zytokin-IL-6 eine zentrale Rolle bezüglich der metabolischen Homöostase spielt, könnte seine Konzentration ebenfalls einen relevanten Einfluss auf das Phosphorylierungslevel der PEVK-Region des skelettalen Titins haben (Febbraio, 2003; Keller et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die IL-6-Konzentration im Skelettmuskel Einfluss auf die Aktivität der „*adenosine monophosphate-activated protein kinase*“ (AMPK) hat, eine Beeinflussung weiterer Kinasen durch eine veränderte Konzentration ist demnach durchaus möglich (Bienso, Knudsen, Brandt, Pedersen, & Pilegaard, 2014; Weigert et al., 2007). Bezüglich der untersuchten I/R-Versuchsproben könnte zudem die Tatsache von Bedeutung sein, dass neben der lokalen Freisetzung des Zytokins durch Muskelkontraktion, die IL-6-Konzentration auch systemisch nach akutem Ischämie-Geschehen erhöht ist (Mazzone et al., 1999). Im Falle der Aktivitätssteigerung einer relevanten Kinase durch eine erhöhte IL-6-Konzentration würde dies zu dem detektierten erhöhten Phosphorylierungslevel der I/R-Tiere im Vergleich mit den Sham-Tieren passen. Für eine Beeinflussung der Zytokin-Konzentration unter diabetischer Stoffwechsellage gibt es zurzeit noch keinen direkten Nachweis. Jedoch konnten frühere Studien zeigen, dass das Zytokin nach Muskelbeanspruchung zum einen die Expression von GLUT4-Transportern erhöht und zum anderen die Insulinsensitivität zu steigern scheint (Ikeda et al., 2016). Auf den GLUT-4-Transporter hat Insulin durch das Induzieren eines gesteigerten Einbaus und einer erhöhten Transkription ebenfalls Einfluss (Behrends et al., 2017). Da bei einem Diabetes Typ II langfristig die Insulinkonzentration sinkt, könnte die IL-6-Konzentration im Falle einer diabetischen Stoffwechsellage möglicherweise kompensatorisch ansteigen um eine gesteigerte Sensitivität des verbleibenden Insulins und eine kompensatorisch gesteigerte Expression des GLUT-4-Transporters zu bewirken. Selbst bei dem Nachweis eines veränderten IL-6-Konzentrationslevel postischämisch und bei diabetischer Stoffwechsellage, bleibt dennoch weiterhin unklar ob die IL-6-Konzentration Einfluss auf die in der Studie nachgewiesenen Modifikationen hat. Weiterführende Untersuchungen könnten zunächst in der Hemmung des IL-6-Zytokins und dem Erfassen des damit einhergehenden veränderten Phosphorylierungslevels der PEVK-Region des skelettalen Titins bestehen. Gleichzeitig könnte die Erfassung einer veränderten Kinase-Aktivität der oben aufgeführten Kinasen nach Zytokin-IL-6-Inhibition weiterführende Erkenntnisse liefern.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass es in allen untersuchten Proben mit induzierter 60-minütiger Ischämie und anschließender 24-stündiger Reperfusion tendenziell zu einer Steigerung der passiven Spannung kommt. Dieser Anstieg korreliert mit dem detektierten gesteigerten Phosphorylierungslevel innerhalb der PEVK-Region, die schon in früheren Studien mit kardialen Titin für eine Steigerung der passiven Spannung verantwortlich gemacht wurde. Weiterführend muss diese Tendenz jedoch noch auf statistische Signifikanz überprüft werden. Auch konnte im Zuge der vorliegenden Studie bisher keine Kinase nachgewiesen werden, die für die detektierte Hyperphosphorylierung der PEVK-Region postischämisch verantwortlich ist. Bei der untersuchten PKC α -Aktivität, welche im kardialen Titin eindeutig für die Phosphorylierung der entsprechenden Positionen der PEVK-Region verantwortlich gemacht werden konnte, zeigte sich keine eindeutige Aktivitätssteigerung. Neben einer weiterführenden Untersuchung der PKC α durch Steigerung der n-Zahl scheint ebenfalls die Untersuchung einer möglicherweise postischämischen Veränderung der CaMKII δ -Aktivität vielversprechend, da im Falle dieser Kinase bereits Phosphorylierungsstellen innerhalb der PEVK-Region von kardialen Titin sowie eine gesteigerte Aktivität nach akutem Myokardinfarkt detektiert werden konnte. Auch ist bisher noch ungeklärt, welche Funktion die Steigerung der passiven Spannung postischämisch in der Skelettmuskulatur einnimmt. Vermutet wird, dass eine gesteigerte passive Spannung als Kompensationsmechanismus dient, um die Muskelfunktion postischämisch aufrecht zu erhalten. Stellt sich diese Vermutung langfristig als richtig heraus, könnte dies zukünftig auch als therapeutischer Ansatzpunkt dienen.

Im Falle der diabetischen Proben konnte im Zuge der Studie hingegen eine statistisch signifikante Hypophosphorylierung an der Position Ser11878 sowie dieselbe Tendenz an der Position Ser12022 der PEVK-Region des Titins der Skelettmuskulatur festgestellt werden. Dieser veränderte Phosphorylierungsstatus geht wiederum nicht wie erwartet mit einer entsprechend verminderten passiven Spannung einher. Eine Vermutung wieso es zu keinem Abfall der entstehenden passiven Spannung kommt, besteht darin, dass weitere Anpassungsreaktionen wie beispielsweise ein gesteigertes oxidatives Stresslevel ein Absinken verhindern. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass es zu Adaptionsreaktionen des Skelettmuskelgewebes im Falle eines Diabetes mellitus Typ II und nach akutem Myokardinfarkt kommt, welche möglicherweise zum aufrecht erhalten der Funktionalität der Skelettmuskulatur dienen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aaronson PI, W. J., Connolly MJ. (2013). *The cardiovascular system at a glance (4th ed.)*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Alegre-Cebollada, J., Kosuri, P., Giganti, D., Eckels, E., Rivas-Pardo, J. A., Hamdani, N., . . . Fernandez, J. M. (2014). S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*, 156(6), 1235-1246. doi:10.1016/j.cell.2014.01.056
- Ali, M. A., Cho, W. J., Hudson, B., Kassiri, Z., Granzier, H., & Schulz, R. (2010). Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 122(20), 2039-2047. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930222
- Ansley, D. M., & Wang, B. (2013). Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol*, 229(2), 232-241. doi:10.1002/path.4113
- Aronson, D., Rayfield, E. J., & Chesebro, J. H. (1997). Mechanisms determining course and outcome of diabetic patients who have had acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*, 126(4), 296-306. doi:10.7326/0003-4819-126-4-199702150-00006
- Bang, M. L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A. J., Gotthardt, M., McNabb, M., . . . Labeit, S. (2001). The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89(11), 1065-1072. doi:10.1161/hh2301.100981
- Bartoo, M. L., Linke, W. A., & Pollack, G. H. (1997). Basis of passive tension and stiffness in isolated rabbit myofibrils. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 1), C266-276. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.1.C266
- Behrends, J., C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., . . . Wischmeyer, E. (2017). *Duale Reihe - Physiologie (3. Aufl.)*. Stuttgart: Thieme.
- Bienso, R. S., Knudsen, J. G., Brandt, N., Pedersen, P. A., & Pilegaard, H. (2014). Effects of IL-6 on pyruvate dehydrogenase regulation in mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 466(8), 1647-1657. doi:10.1007/s00424-013-1399-5
- Blaisdell, F. W. (2002). The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*, 10(6), 620-630. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453699>
- Blum, H. E., Müller-Wieland, D. (2018). *Klinische Pathophysiologie (10. Aufl.)*. New York, Stuttgart: Georg Thieme.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., Höfler, G., Kreipe, H., & Moch, H. (2012). *Pathologie (5. Aufl.)*. Muenchen: Elsevier.
- Boerrigter, G., Costello-Boerrigter, L. C., Cataliotti, A., Lapp, H., Stasch, J. P., & Burnett, J. C., Jr. (2007). Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension*, 49(5), 1128-1133. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.083832
- Bundesamt, S. D-Statist.
- Carden, D. L., & Granger, D. N. (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190(3), 255-266. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6
- Cazorla, O., Wu, Y., Irving, T. C., & Granzier, H. (2001). Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res*, 88(10), 1028-1035. doi:10.1161/hh1001.090876
- Chauveau, C., Rowell, J., & Ferreira, A. (2014). A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat*, 35(9), 1046-1059. doi:10.1002/humu.22611
- Conibear, A. C., Rosengren, K. J., Becker, C. F. W., & Kaehlig, H. (2019). Random coil shifts of posttranslationally modified amino acids. *J Biomol NMR*. doi:10.1007/s10858-019-00270-4
- Delort, F., Segard, B. D., Hakibilen, C., Bourgois-Rocha, F., Cabet, E., Vicart, P., . . . Battonnet-Pichon, S. (2019). Alterations of redox dynamics and desmin post-translational modifications in skeletal muscle models of desminopathies. *Exp Cell Res*, 111539. doi:10.1016/j.yexcr.2019.111539
- Echouffo-Tcheugui, J. B., Kolte, D., Khera, S., Aronow, H. D., Abbott, J. D., Bhatt, D. L., & Fonarow, G. C. (2018). Diabetes Mellitus and Cardiogenic Shock Complicating Acute Myocardial Infarction. *Am J Med*, 131(7), 778-786 e771. doi:10.1016/j.amjmed.2018.03.004
- Edwin Hoa, K. K. G., b, Chia-Chi Liua, Ravi Bhindia,b, Gemma A. Figtre. (31 July 2013). Redox Biology. *ElSevier - ScienceDirect*, 483-491.

- Falcao-Pires, I., Hamdani, N., Borbely, A., Gavina, C., Schalkwijk, C. G., van der Velden, J., . . . Paulus, W. J. (2011). Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation*, *124*(10), 1151-1159. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025270
- Febbraio, M. A. (2003). Signaling pathways for IL-6 within skeletal muscle. *Exerc Immunol Rev*, *9*, 34-39. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14686092>
- Figueiredo-Freitas, C., Dulce, R. A., Foster, M. W., Liang, J., Yamashita, A. M., Lima-Rosa, F. L., . . . Pinto, J. R. (2015). S-Nitrosylation of Sarcomeric Proteins Depresses Myofilament Ca²⁺Sensitivity in Intact Cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal*, *23*(13), 1017-1034. doi:10.1089/ars.2015.6275
- Frangogiannis, N. G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*, *11*(5), 255-265. doi:10.1038/nrcardio.2014.28
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougereousse, F., Centner, T., . . . Labeit, S. (2000). Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, *86*(11), 1114-1121. doi:10.1161/01.res.86.11.1114
- Gartner, V., & Eigentler, T. K. (2008). Pathogenesis of diabetic macro- and microangiopathy. *Clin Nephrol*, *70*(1), 1-9. doi:10.5414/cnp70001
- Gasparovic, A. C., Jaganjac, M., Mihaljevic, B., Sunjic, S. B., & Zarkovic, N. (2013). Assays for the measurement of lipid peroxidation. *Methods Mol Biol*, *965*, 283-296. doi:10.1007/978-1-62703-239-1_19
- Gautel, M. (2011). The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol*, *23*(1), 39-46. doi:10.1016/j.ceb.2010.12.001
- Geraldes, P., & King, G. L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*, *106*(8), 1319-1331. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.217117
- Granzier, H. L., & Irving, T. C. (1995). Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*, *68*(3), 1027-1044. doi:10.1016/S0006-3495(95)80278-X
- Granzier, H. L., & Wang, K. (1993a). Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis*, *14*(1-2), 56-64. doi:10.1002/elps.1150140110
- Granzier, H. L., & Wang, K. (1993b). Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles: the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. *Biophys J*, *65*(5), 2141-2159. doi:10.1016/S0006-3495(93)81262-1
- Grundmann, R., A., Müller-Hermelink, H. K., Kirchner, Th. (2014). *Pathologie (12. Auflage)*. München: Elsevier.
- Grutzner, A., Garcia-Manyes, S., Kotter, S., Badilla, C. L., Fernandez, J. M., & Linke, W. A. (2009). Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*, *97*(3), 825-834. doi:10.1016/j.bpj.2009.05.037
- Hage-Sleiman, R., Hamze, A. B., Reslan, L., Kobeissy, H., & Dbaibo, G. (2015). The Novel PKC θ from Benchtop to Clinic. *J Immunol Res*, *2015*, 348798. doi:10.1155/2015/348798
- Hamdani, N., Franssen, C., Lourenco, A., Falcao-Pires, I., Fontoura, D., Leite, S., . . . Paulus, W. J. (2013). Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail*, *6*(6), 1239-1249. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000539
- Hamdani, N., Hervent, A. S., Vandekerckhove, L., Matheussen, V., Demolder, M., Baerts, L., . . . De Keulenaer, G. W. (2014). Left ventricular diastolic dysfunction and myocardial stiffness in diabetic mice is attenuated by inhibition of dipeptidyl peptidase 4. *Cardiovasc Res*, *104*(3), 423-431. doi:10.1093/cvr/cvu223
- Hamdani, N., Krysiak, J., Kreusser, M. M., Neef, S., Dos Remedios, C. G., Maier, L. S., . . . Linke, W. A. (2013). Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, *112*(4), 664-674. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300105
- Hein, S., Scholz, D., Fujitani, N., Renollet, H., Brand, T., Friedl, A., & Schaper, J. (1994). Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, *26*(10), 1291-1306. doi:10.1006/jmcc.1994.1148
- Heinrich, P. C. M., M.; Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*: Springer.
- Helmes, M., Lim, C. C., Liao, R., Bharti, A., Cui, L., & Sawyer, D. B. (2003). Titin determines the Frank-Starling relation in early diastole. *J Gen Physiol*, *121*(2), 97-110. doi:10.1085/jgp.20028652

- Helmes, M., Trombitas, K., & Granzier, H. (1996). Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, *79*(3), 619-626. doi:10.1161/01.res.79.3.619
- Hendus-Altenburger, R., Fernandes, C. B., Bugge, K., Kunze, M. B. A., Boomsma, W., & Kragelund, B. B. (2019). Random coil chemical shifts for serine, threonine and tyrosine phosphorylation over a broad pH range. *J Biomol NMR*. doi:10.1007/s10858-019-00283-z
- Herold, G. (2019). *Innere Medizin Köln*: Herold.
- Hidalgo, C., & Granzier, H. (2013). Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med*, *23*(5), 165-171. doi:10.1016/j.tcm.2012.10.005
- Hidalgo, C., Hudson, B., Bogomolovas, J., Zhu, Y., Anderson, B., Greaser, M., . . . Granzier, H. (2009). PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, *105*(7), 631-638, 617 p following 638. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.198465
- Hien, P. B., B. (2005). Pathogenese und Entwicklung des Typ 2-Diabetes mellitus. In *Diabetes-Handbuch (4. Aufl.)* (pp. 21-23). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Hopf, A. E., Andresen, C., Kotter, S., Isic, M., Ulrich, K., Sahin, S., . . . Kruger, M. (2018). Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res*, *123*(3), 342-355. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312166
- Hudson, B. D., Hidalgo, C. G., Gotthardt, M., & Granzier, H. L. (2010). Excision of titin's cardiac PEVK spring element abolishes PKC α -induced increases in myocardial stiffness. *J Mol Cell Cardiol*, *48*(5), 972-978. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.12.006
- Hwang, S. L., Jeong, Y. T., Li, X., Kim, Y. D., Lu, Y., Chang, Y. C., . . . Chang, H. W. (2013). Inhibitory cross-talk between the AMPK and ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Br J Pharmacol*, *169*(1), 69-81. doi:10.1111/bph.12124
- Ikeda, S. I., Tamura, Y., Kakehi, S., Sanada, H., Kawamori, R., & Watada, H. (2016). Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, *473*(4), 947-952. doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.159
- Itani, S. I., Pories, W. J., Macdonald, K. G., & Dohm, G. L. (2001). Increased protein kinase C θ in skeletal muscle of diabetic patients. *Metabolism*, *50*(5), 553-557. doi:10.1053/meta.2001.22512
- Iwasaka, T., Takahashi, N., Nakamura, S., Sugiura, T., Tarumi, N., Kimura, Y., . . . Inada, M. (1992). Residual left ventricular pump function after acute myocardial infarction in NIDDM patients. *Diabetes Care*, *15*(11), 1522-1526. doi:10.2337/diacare.15.11.1522
- Jordan, J. E., Zhao, Z. Q., & Vinten-Johansen, J. (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, *43*(4), 860-878. doi:10.1016/s0008-6363(99)00187-x
- Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., Gratzl, M. (2005). *Histologie (6. Auflage)*. Rio de Janeiro, New York, Heidelberg: Springer.
- Keller, P., Penkowa, M., Keller, C., Steensberg, A., Fischer, C. P., Giralt, M., . . . Pedersen, B. K. (2005). Interleukin-6 receptor expression in contracting human skeletal muscle: regulating role of IL-6. *FASEB J*, *19*(9), 1181-1183. doi:10.1096/fj.04-3278fj
- Kötter, S., Andresen, C., & Kruger, M. (2014). Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, *395*(11), 1341-1352. doi:10.1515/hsz-2014-0178
- Kötter, S., Gout, L., Von Frieling-Salewsky, M., Muller, A. E., Helling, S., Marcus, K., . . . Kruger, M. (2013). Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, *99*(4), 648-656. doi:10.1093/cvr/cvt144
- Kötter, S., Kazmierowska, M., Andresen, C., Bottermann, K., Grandoch, M., Gorressen, S., . . . Kruger, M. (2016). Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, *119*(9), 1017-1029. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309685
- Krüger, M., Kohl, T., & Linke, W. A. (2006). Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca²⁺ sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *291*(2), H496-506. doi:10.1152/ajpheart.00114.2006
- Krüger, M., & Kötter, S. (2016). Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol*, *7*, 76. doi:10.3389/fphys.2016.00076
- Krüger, M., Kötter, S., Grutzner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M. M., . . . Linke, W. A. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, *104*(1), 87-94. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.184408

- Krüger, M., & Linke, W. A. (2009). Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, *46*(4), 490-498. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19639676>
- Krüger, M., & Linke, W. A. (2011). The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, *286*(12), 9905-9912. doi:10.1074/jbc.R110.173260
- Lange, S., Ehler, E., & Gautel, M. (2006). From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol*, *16*(1), 11-18. doi:10.1016/j.tcb.2005.11.007
- Lee, E. H., Hsin, J., Mayans, O., & Schulten, K. (2007). Secondary and tertiary structure elasticity of titin Z1Z2 and a titin chain model. *Biophys J*, *93*(5), 1719-1735. doi:10.1529/biophysj.107.105528
- Leite, F. S., Minozzo, F. C., Kalganov, A., Cornachione, A. S., Cheng, Y. S., Leu, N. A., . . . Rassier, D. E. (2016). Reduced passive force in skeletal muscles lacking protein arginylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, *310*(2), C127-135. doi:10.1152/ajpcell.00269.2015
- Linke, W. A., Ivemeyer, M., Olivieri, N., Kolmerer, B., Ruegg, J. C., & Labeit, S. (1996). Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, *261*(1), 62-71. doi:10.1006/jmbi.1996.0441
- Linke, W. A., & Kruger, M. (2010). The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda)*, *25*(3), 186-198. doi:10.1152/physiol.00005.2010
- Linke, W. A., Rudy, D. E., Centner, T., Gautel, M., Witt, C., Labeit, S., & Gregorio, C. C. (1999). I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol*, *146*(3), 631-644. doi:10.1083/jcb.146.3.631
- Lüllman-Rauch, R., Asan, E. (2019). *Histologie (6. Auflage)*. Stuttgart, New York: Thieme.
- Mazzone, A., De Servi, S., Vezzoli, M., Fossati, G., Mazzucchelli, I., Gritti, D., . . . Specchia, G. (1999). Plasma levels of interleukin 2, 6, 10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease. *Atherosclerosis*, *145*(2), 369-374. doi:10.1016/s0021-9150(99)00104-5
- Musaro, A., Fulle, S., & Fano, G. (2010). Oxidative stress and muscle homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *13*(3), 236-242. doi:10.1097/MCO.0b013e3283368188
- Neagoe, C., Opitz, C. A., Makarenko, I., & Linke, W. A. (2003). Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*, *24*(2-3), 175-189. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609029>
- Olivier, A. R., & Parker, P. J. (1992). Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3 cells: differential down-regulation by phorbol ester. *J Cell Physiol*, *152*(2), 240-244. doi:10.1002/jcp.1041520204
- Ortmeyer, H. K. (1997). Insulin decreases skeletal muscle cAMP-dependent protein kinase (PKA) activity in normal monkeys and increases PKA activity in insulin-resistant rhesus monkeys. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, *8*(4), 223-235. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651796>
- Paulson, D. J. (1997). The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovasc Res*, *34*(1), 104-112. doi:10.1016/s0008-6363(97)00018-7
- Politou, A. S., Thomas, D. J., & Pastore, A. (1995). The folding and stability of titin immunoglobulin-like modules, with implications for the mechanism of elasticity. *Biophys J*, *69*(6), 2601-2610. doi:10.1016/S0006-3495(95)80131-1
- Prado, L. G., Makarenko, I., Andresen, C., Kruger, M., Opitz, C. A., & Linke, W. A. (2005). Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol*, *126*(5), 461-480. doi:10.1085/jgp.200509364
- Raskin, A., Lange, S., Banares, K., Lyon, R. C., Zieseniss, A., Lee, L. K., . . . Sheikh, F. (2012). A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem*, *287*(35), 29273-29284. doi:10.1074/jbc.M112.372839
- Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *J Cell Biochem*, *118*(11), 3577-3585. doi:10.1002/jcb.26097
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S. E., Ward, C., . . . Marks, A. R. (2003). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol*, *160*(6), 919-928. doi:10.1083/jcb.200211012
- Ringvold, H. C., & Khalil, R. A. (2017). Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. *Adv Pharmacol*, *78*, 203-301. doi:10.1016/bs.apha.2016.06.002
- Salamanca, D. A., & Khalil, R. A. (2005). Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol*, *70*(11), 1537-1547. doi:10.1016/j.bcp.2005.07.017

- Silveira, W. A., Goncalves, D. A., Graca, F. A., Andrade-Lopes, A. L., Bergantin, L. B., Zanon, N. M., . . . Navegantes, L. C. (2014). Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. *J Appl Physiol* (1985), 117(1), 11-19. doi:10.1152/jappphysiol.01055.2013
- Stone, P. H., Muller, J. E., Hartwell, T., York, B. J., Rutherford, J. D., Parker, C. B., . . . et al. (1989). The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. The MILIS Study Group. *J Am Coll Cardiol*, 14(1), 49-57. doi:10.1016/0735-1097(89)90053-3
- Trombitas, K., Greaser, M., French, G., & Granzier, H. (1998). PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10. *J Struct Biol*, 122(1-2), 188-196. doi:10.1006/jsbi.1998.3984
- Unpublished. (2019). *M. Isic: Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf adaptive Titin Modifikationen nach myokardialer Ischämie/Reperfusion*
- Vary, T. C., Deiter, G., & Lang, C. H. (2004). Diminished ERK 1/2 and p38 MAPK phosphorylation in skeletal muscle during sepsis. *Shock*, 22(6), 548-554. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545827>
- Vila-Petroff, M., Salas, M. A., Said, M., Valverde, C. A., Sapia, L., Portiansky, E., . . . Mattiazzi, A. (2007). CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 73(4), 689-698. doi:10.1016/j.cardiores.2006.12.003
- Volterrani, M., Clark, A. L., Ludman, P. F., Swan, J. W., Adamopoulos, S., Piepoli, M., & Coats, A. J. (1994). Predictors of exercise capacity in chronic heart failure. *Eur Heart J*, 15(6), 801-809. doi:10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a060588
- Weigert, C., Dufer, M., Simon, P., Debre, E., Runge, H., Brodbeck, K., . . . Schleicher, E. D. (2007). Upregulation of IL-6 mRNA by IL-6 in skeletal muscle cells: role of IL-6 mRNA stabilization and Ca²⁺-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(3), C1139-1147. doi:10.1152/ajpcell.00142.2007
- Welsch, U., Kummer, W., Deller, T. (2018). *Histologie - Das Lehrbuch (5. Auflage)*. München: Elsevier.
- Williams, J. H., & Ward, C. W. (1998). Changes in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum function and force production following myocardial infarction in rats. *Exp Physiol*, 83(1), 85-94. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9483422>
- Witt, C. C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H., & Labeit, S. (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J*, 25(16), 3843-3855. doi:10.1038/sj.emboj.7601242
- Yamazaki, T., Komuro, I., & Yazaki, Y. (1995). Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress. *J Mol Cell Cardiol*, 27(1), 133-140. doi:10.1016/s0022-2828(08)80013-2
- Young, M. E., & Leighton, B. (1998). Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP--evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, 424(1-2), 79-83. doi:10.1016/s0014-5793(98)00143-4
- Zarich, S. W., & Nesto, R. W. (2007). Implications and treatment of acute hyperglycemia in the setting of acute myocardial infarction. *Circulation*, 115(18), e436-439. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535732

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich im Besonderen bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Martina Krüger bedanken, für die Zuverlässigkeit, mit der Sie die Fertigstellung dieser Arbeit betreut hat. Ich möchte Ihr danken, dass Sie mir jeder Zeit mit konstruktiver Kritik und Ratschlägen zur Seite stand und ebenso möchte ich Ihr für den Freiraum danken, den Sie mir für die Fertigstellung der Arbeit eingeräumt hat. Danke, dass Sie das Gelingen dieser Arbeit möglich gemacht haben.

Außerdem möchte ich für die engagierte Betreuung im Labor durch Dr. Malgorzata Isic und Dr. Sebastian Kötter danken. Auch möchte ich Frau Sabine Bongardt danke, die mir mit vielseitiger Unterstützung bei der Arbeit im Labor zur Seite stand.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Optimismus während der Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben, gilt mein besonderer Dank.