

**Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke**

**Der Einfluss von Diabetes mellitus Typ 1 auf die Titin-
Phosphorylierung in Herz- und Skelettmuskulatur im Rattenmodell**

Dissertation

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

**vorgelegt von
Lukas Johannes Möschter**

2021

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

gez.: Sandra König

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Zweitgutacher: Prof. Dr. Joachim Schmitt

**Für die gegenseitige Achtsamkeit, die körperliche und seelische Unversehrtheit und das Vertrauen in das Leben. Für alle Menschen, die mich
bisher mit ihrer Liebe begleitet haben.**

Zusammenfassung

Titin ist das größte bekannte Protein des menschlichen Körpers. Innerhalb des Sarkomers fungiert es als molekulare Feder und ist unter anderem für die passiven Rückstellkräfte während des Kontraktionszyklus verantwortlich. Es spannt sich zwischen Z-Scheibe und M-Band auf und überbrückt somit Aktin und Myosin, als integraler Bestandteil des Sarkomers.

Bei vielen Diabetiker*innen entwickelt sich im Verlauf der Erkrankung eine diabetische Kardiomyopathie, die mit einer diastolischen Dysfunktion mit erhöhter passiver Myokardsteifigkeit einhergeht. Die Phosphorylierung von Titin spielt für die passive Myokardsteifigkeit eine wichtige Rolle. Zwei Titin-Proteindomänen sind hier von zentraler Bedeutung: die sogenannte PEVK-Region, die durch erhöhte Phosphorylierung steifer wird, und die herzspezifische N2-B *unique sequence*, die durch erhöhte Phosphorylierung weniger steif wird.

Auf Ebene der Skelettmuskulatur ist häufiger eine diabetische Myopathie mit einer Minderung der aktiven Muskelkraft zu beobachten. Hier ist bisher nicht geklärt, ob diese auch mit einer Veränderung der passiven Steifigkeit einhergeht.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Phosphorylierungslevel von Titin in der Herzmuskulatur von Ratten, die durch Behandlung mit Streptozotocin (STZ) einen absoluten Insulinmangel und somit Typ 1 Diabetes mellitus entwickelten. Neben den linksventrikulären Proben wurden ebenfalls Proben des Musculus quadriceps femoris und Musculus psoas untersucht. Beurteilt wurde repräsentativ die relative Phosphorylierung der Serinreste (S) 4010 und 4099 in der herzspezifischen N2-B *unique sequence* und S 11878 und S 12022 in der PEVK-Region. Zusätzlich wurden innerhalb der entsprechenden Signalwege noch PKC α und Troponin I auf ihren Phosphorylierungsstatus überprüft.

Per SDS-PAGE und Western Blot wurde eine vergleichende Analyse der Titin-Phosphorylierungslevel in STZ-behandelten und unbehandelten Tieren (je n=3-5/Gruppe) durchgeführt. Für den linken Ventrikel wurden Tiere im Alter von 12 Wochen und 20 Wochen verglichen. Für die Analyse der Skelettmuskulatur wurden Tiere im Alter von 20 Wochen herangezogen.

In den linksventrikulären Proben der 20 Wochen alten Tiere konnte festgestellt werden, dass der Serinrest 12022 in der Titin-PEVK-Region eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Phosphorylierung aufwies. Diese Veränderung konnte bei Vergleichsversuchen mit den 12 Wochen alten Tieren nicht nachgewiesen werden. Verstärkte Phosphorylierung der kardialen Titin-PEVK-Region ist mit einem Anstieg der passiven Myozytensteifigkeit assoziiert. Die Ergebnisse dieser Studie untermauern die Hypothese, dass eine diastolische Dysfunktion bei Diabetiker*innen durch Titinphosphorylierung in der PEVK-Region und damit einer wahrscheinlichen Zunahme der passiven Myozytensteifigkeit mitverursacht wird.

Interessanterweise zeigten sich in der Analyse der Musculi quadriceps femoris und Musculi psoas der 20 Wochen alten Tiere teils gegenteilige Veränderungen. Hier waren die Phosphorylierungslevel bei den diabetischen Proben in der Titin-PEVK-Region am S11878 vermindert, was eine Abnahme der passiven Myozytensteifigkeit vermitteln sollte. Im Musculus psoas war gleichzeitig allerdings, wie im linken Ventrikel auch, S12022 erhöht phosphoryliert. Dies deutet daraufhin, dass Diabetes mellitus Typ 1 auf Titin-Ebene auch die Muskelsteifigkeit adaptiv bzw. maladaptiv beeinflussen könnte. Unklar ist hier die Auswirkung auf die Funktionsfähigkeit der Skelettmuskulatur.

Auch in den untersuchten Kinase-Signalwegen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. PKC α und TroponinI waren in ihrem Phosphorylierungsstatus in den beiden Versuchsgruppen unverändert. Dies weist bei jeweils unterschiedlichen Phosphorylierungsleveln in der Titin-PEVK-Region daraufhin, dass hier noch andere Kinasen, wie z.B. CamKII δ , aktiv sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Diabetes mellitus Typ1 einen Einfluss auf die Titinmodifikation hat. Zukünftige Studien müssen zeigen, inwiefern sich diese auf funktioneller Ebene auswirkt.

Abstract

Titin is the largest known protein in the human body. It acts as a molecular spring in the muscle sarcomere and, amongst other things, determines the passive force of the myofilaments during the contraction cycle. As an integrative component of the sarcomeric structure, it extends between Z-disk and M-line and bridges actin and myosin.

Many diabetic patients develop diabetic cardiomyopathy with diastolic dysfunction caused by increased passive myocardial stiffness. The phosphorylation of titin plays an important role in modifying passive myocardial stiffness. Two protein domains of titin are particularly important here: The so-called PEVK region, the stiffness of which increases through phosphorylation, and the cardiac-specific N2-B-unique sequence, the stiffness of which decreases through phosphorylation.

For skeletal muscle, diabetic myopathy with loss of active muscle was often observed. As of yet it is unclear if there is a change of passive stiffness, too.

The focus of this work was to investigate the phosphorylation levels of titin in the heart muscle of rats that developed absolute insulin deficiency and thus type 1 diabetes mellitus after treatment with streptozotocin (STZ). Samples of the left ventricle, the quadriceps femoris, and the psoas were studied. We evaluated representatively the relative phosphorylation of the serin phosphosites (S) 4010 and 4099 in the cardiac N2-B-unique sequence, and S11878 and S12022 in PEVK region of titin. Additionally, we analyzed the phosphorylation status of PKC α and troponinI.

Titin phosphorylation levels of STZ-treated and untreated animals (n=3-5/group) were analyzed and compared with using SDS-PAGE and Western-blot. Samples for the analysis of left ventricular tissue originated from 12- and 20-week-old animals. Samples of the skeletal muscle tissue were excised from 20-week-old animals.

In the left ventricular samples of 20-weeks-old rats, we identified a significantly increased relative phosphorylation of S12022 compared to the untreated/non-diabetic group. This effect was not present in the 12-week-old rats. Increased phosphorylation of the myocardial titin-PEVK region is associated with higher passive stiffness. The results of this study support the hypothesis that diastolic dysfunction in diabetes is in part caused by titin-phosphorylation in PEVK region and probably by the concomitant increase in passive myocardial stiffness.

Examination of the quadriceps femoris and psoas of the 20-week-old animals demonstrates that the phosphorylation of S11878 in titin-PEVK region was significantly reduced, suggesting reduced passive stiffness of the myocytes. However, in psoas tissue we could identify increased phosphorylation of S12022 as well as in the left ventricle. We therefore conclude that type 1 diabetes mellitus could have an influence on the stiffness of myocytes in an adaptive or maladaptive way. Consequences of these findings on the functionality of skeletal muscle remain unclear.

No differences were detected in the relative phosphorylation level of PKC α and troponinI between these two experimental groups. The findings suggest that other kinases like CaMKII δ may cause the observed diabetes-induced changes in titin-PEVK-region phosphorylation.

In sum, it was shown that diabetes mellitus type 1 influences the modification of titin. Future studies will have to investigate how this modification affects functioning.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AC	Adenylylzyklase
AKT	Proteinkinase B
AngII	Angiotensin II
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII δ	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II δ
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
dl	Deziliter
DTT	Dithiothreitol
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK1/2	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase-1/2
et al.	<i>et alii</i> (=und andere)
ET-1	Endothelin-1
GLUT2 u. 4	Glucosetransporter 2 und 4
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HFpEF	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
HFrEF	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
Ig	Immunglobulin bzw. Immunglobulin-ähnlich
InR	Insulin-Rezeptor
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kDa;MDa	Kilodalton;Megadalton
kg	Kilogramm
LV	Linker Ventrikel
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK1/2	MAPK/ERK Kinase-1 und -2
mg	Milligramm
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MP	Musculus psoas
MQF	Musculus quadriceps femoris
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mechanistic target of Rapamycin</i>
n	Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche

N2-Bus	N2-B <i>unique sequence</i>
NF-kappaB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
P	Phosphorylierungsstelle
p38 MAP-Kinase	p38 mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PDE5	Phosphodiesterase 5
PKD1	<i>phosphoinositide</i> -abhängige Proteinkinase 1
PEVK-Region	Region, die reich an Prolin, Glutamat, Valin und Lysin ist
pGC	Partikuläre Guanylylzyklase
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3K	phosphoinositide 3-Kinase
PKA	(cAMP-abhängige) Proteinkinase A
PKCα	(Ca ²⁺ -abhängige) Proteinkinase C α
PKG	(cGMP-abhängige) Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i> Protein
Ras	<i>Rat sarcoma</i> Protein
RBM20	<i>RNA binding motif 20</i>
S	Serinrest
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
sGC	Lösliche Guanylylzyklase
STZ	Streptozotozin
T	Threoninrest
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
T3	Trijodthyronin
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
us	<i>unique sequence</i> (=einzigartige Sequenz)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w	Woche
w/v	Gewicht pro Volumen
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sarkomeraufbau und Titin als Strukturelement.....	1
1.1.1	Herzmuskulatur.....	1
1.1.1.1	Allgemeine makroskopische/mikroskopische Struktur.....	1
1.1.1.2	Titinbasierte Modulation der Steifigkeit in der Herzmuskulatur	4
1.1.1.3	Rolle von Titin bei pathophysiologischen Veränderungen in der Herzmuskulatur	9
1.1.2	Skelettmuskulatur	11
1.1.2.1	Unterschiede im Aufbau zur Herzmuskulatur.....	11
1.1.2.2	Titinbasierte Modulation der Steifigkeit in der Skelettmuskulatur	12
1.2	Diabetes mellitus.....	13
1.2.1	Allgemein/Ätiologie/Pathogenese/Diagnostik	13
1.2.2	Übersicht Diabetes mellitus Typ 2	13
1.2.3	Übersicht Diabetes mellitus Typ 1	15
1.2.4	Folgeerkrankungen - allgemein.....	16
1.2.5	Folgeerkrankungen - diabetische Kardiomyopathie	16
1.2.6	Folgeerkrankungen - diabetische Myopathie	18
1.2.7	Streptozotizin behandelte Ratten als Diabetes mellitus Typ 1 Modell.....	19
1.3	Ziele der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Biologisches Material/Gewebeproben	22
2.1.2	Reagenzien	22
2.1.3	Lösungen und Puffer	23
2.1.4	Antikörper	24
2.1.5	Geräte.....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Proteinbiochemie.....	26
2.2.1.1	Herstellung der Proteinlysate	26
2.2.1.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.2.1.3	Western Blot	28
2.2.1.4	Inkubation der Antikörper.....	29
2.2.2	Statistische Auswertung.....	30
2.2.3	Software	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Analyse der Titin-Phosphorylierungslevel des linken Ventrikels	31

3.1.1	PEVK-Serinrest 12022 ist bei 20 Wochen alten STZ-Tieren erhöht phosphoryliert..	31
3.1.2	Kein Unterschied der Phosphorylierungslevel in N2-Bus-Region	33
3.1.3	Keine Unterschiede in der Phosphorylierung möglicher beteiligter Kinasen	35
3.2	Analyse der Titin-Phosphorylierungslevel der Musculi quadriceps femoris und psoas	37
3.2.1	S11878 vermindert und S12022 in Musculus psoas erhöht phosphoryliert.....	37
3.2.2	Kein Unterschied in der PKC α -Phosphorylierung.....	39
4	Diskussion.....	40
4.1	Diabetes mellitus Typ 1 erhöht die Titin-PEVK Phosphorylierung im Myokard – Hinweis auf diastolische Dysfunktion	40
4.2	Diabetes mellitus Typ 1 beeinflusst die Phosphorylierung von Titin in der Skelettmuskulatur	45
4.3	Regulation der Titin-Phosphorylierung über Signalwege bei Diabetes mellitus Typ 1.	51
4.4.	Limitationen	54
4.5.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	56
5	Quellenverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Sarkomeraufbau und Titin als Strukturelement

1.1.1 Herzmuskulatur

1.1.1.1 Allgemeine makroskopische/mikroskopische Struktur

Die Herzmuskulatur wird, wie die Skelettmuskulatur, zur quergestreiften Muskulatur gezählt (Abb.1). Diese Bezeichnung beruht auf der parallelen Anordnung und dem Lichtbrechungsverhalten der Sarkomere unter dem Polarisationsmikroskop. Hauptsächlich unterschieden werden dabei I-Banden und A-Banden. Die I-Banden sind die isotropen bzw. wenig doppelbrechenden Bereiche. Aktin ist hier das vorherrschende Protein. A-Banden sind die anisotropen bzw. doppelbrechenden Bereiche des Sarkomers. Die Proteinstruktur ist hier dichter, da sich die dicken Myosin- und die Aktinfilamente überlappen. Herzmuskelzellen sind polyploid und über *gap junctions* zur Erregungsweiterleitung eng miteinander verknüpft. Die engen Zellverbindungen fallen als sog. Glanzstreifen im lichtmikroskopischen Bild auf.

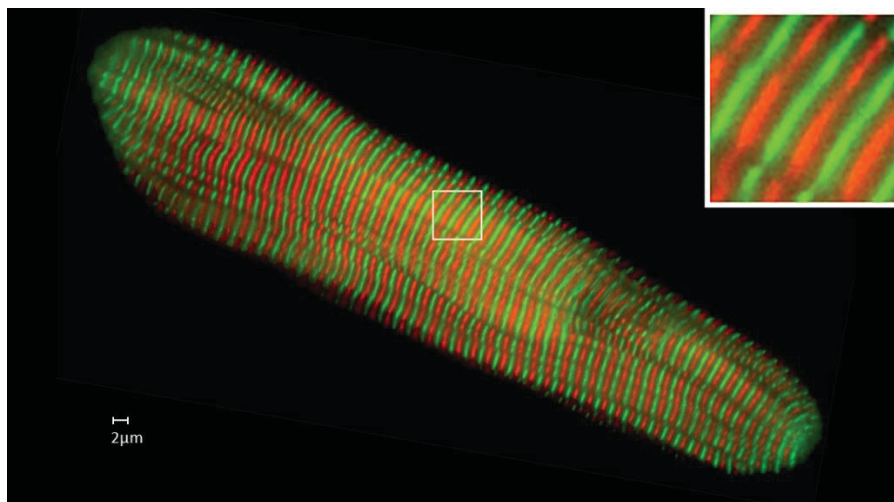


Abb.1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer gefärbten adulten Rattenkardiomyozyte 1000 fach vergrößert. In Rot dargestellt ist alpha-Actinin, ein Z-Scheiben-Protein. In Grün dargestellt ist der M-Banden-Bereich von Titin (M8-M10). Zu sehen ist die „Querstreifung“ der Muskulatur mit dem regelmäßigen Wechsel von Z-Scheibe und M-Bande (Mit freundlicher Genehmigung durch Erik Müller aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der HHU Düsseldorf).

Die im Ruhezustand 1,6 bis 2,2µm langen Sarkomere bilden die kleinsten funktionellen Einheiten eines Muskels, die durch zwei Z-Scheiben begrenzt werden (Abb.2). Die Z-Scheiben liegen innerhalb der I-Bande und bilden den Fixpunkt für u.a. die dünneren

Aktinfilamente. Diese Aktinfilamente überlappen sich mit den dickeren Myosinfilamenten, die in ihrer Mitte an der M-Bande verankert sind. Die M-Bande wiederum ist in der Mitte der A-Bande lokalisiert (Abb.1 u. 2).

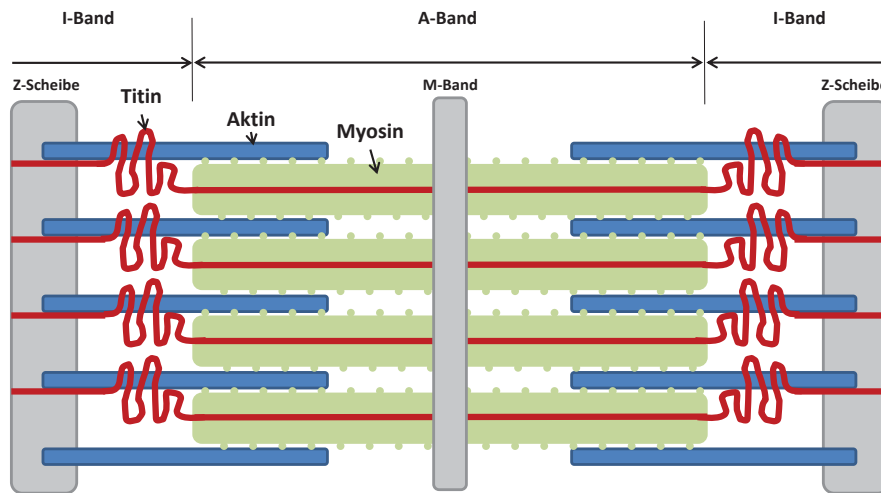


Abb.2: Schematischer Sarkomeraufbau. Innerhalb des Sarkomers greifen Aktin und Myosin zur aktiven Kraftentwicklung ineinander. Titin ist für die passive Kraftentwicklung als Stellfeder des Sarkomers wichtig und spannt sich zwischen M-Band und Z-Scheibe auf. Das A-Band erscheint unter dem Polarisationsmikroskop doppelbrechend (=anisotrop). Das I-Band erscheint hingegen nicht-doppelbrechend (=isotrop). Das M-Band ist die Aufhängestruktur der Myosinfilamente. Die Z-Scheibe begrenzt das Sarkomer und ist die Aufhängestruktur für die Aktin- und Titinfilamente. Modifiziert nach Bärthlein (2019).

Die aktive Kontraktion eines Muskels lässt sich auf Ebene des Sarkomers mit dem Querbrückenzyklus beschreiben. Dazu binden die Myosinköpfchen an Bindungsstellen an Aktin und ziehen diese durch Abknicken in Richtung M-Scheibe. Die Energie für diesen Vorgang wird durch eine ATPase in den Myosinköpfchen bereitgestellt.

Das dritte wichtige Filamentprotein ist Titin, das sich zwischen Z-Scheibe und M-Band aufspannt (Fürst et al., 1988, Funatsu et al., 1993) und Myosin mit der Z-Scheibe verbindet (Labeit et al., 1992). Durch seine vielen Bindungsstellen zu anderen Proteinen und seine elastischen Eigenschaften ist es als strukturgebendes Element im Sarkomer für die passive Steifigkeit von zentraler Bedeutung (Granzier and Irving, 1995).

Mit einer Größe von bis zu 3,7MDa ist Titin das größte bekannte Protein des menschlichen Körpers. Es wird aus nur einem Gen, dem TTN Gen, das aus 363 Exons besteht, synthetisiert (Bang et al., 2001). Durch alternatives *splicing* werden drei Hauptisoformen gebildet. Die ca. 3MDa große N2B-Isoform und die ca. 3,2-3,7MDa große N2BA-Isoform befinden sich in Kardiomyozyten (Freiburg et al., 2000). In der Skelettmuskulatur wird hauptsächlich die N2A-Isoform gebildet (Freiburg et al., 2000).

Die N2B- und N2BA-Isoformen zeichnen sich dadurch aus, dass sie jeweils eine N2-B *unique sequence* (N2-Bus) beinhalten. Unterscheiden lassen sie sich allerdings durch verschiedene Eigenschaften in Hinblick auf die Elastizität. Die kardiale kleinere N2B-Isoform zeichnet sich im Gegensatz zur kardialen N2BA durch eine erhöhte passive Steifigkeit aus (Freiburg et al., 2000).

Titin kann strukturell grob in einen I-Banden- und einen A-Banden-Teil gegliedert werden, der jeweils durch die Z-Scheibe und M-Band begrenzt wird (Abb.3).

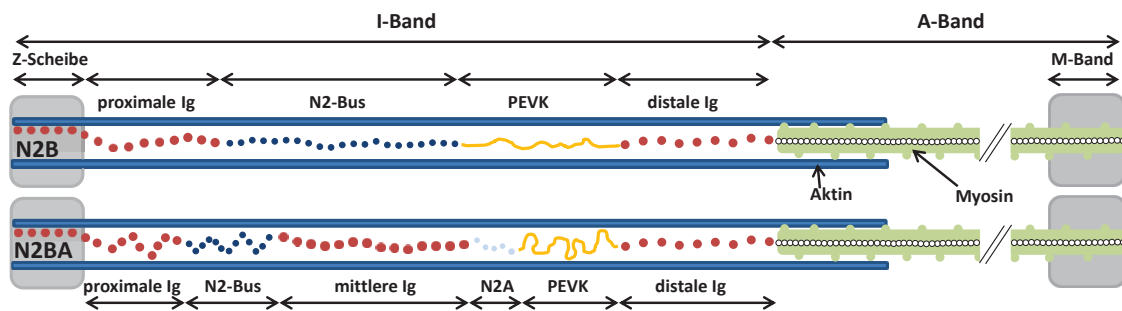


Abb.3: Schematische Darstellung der kardialen Titin-N2B- und N2BA-Isoformen im Halbsarkomer. Dargestellt ist Aufbau der kardialen N2B- und N2BA-Isoformen im Halbsarkomer zwischen Z-Scheibe und M-Band. Innerhalb des I-Bandes liegen verschiedene Subeinheiten, die die elastischen Eigenschaften von Titin bestimmen. Beide Isoformen enthalten eine proximale und distale Ig (Immunglobulin)-Domäne und die, für die passive Steifigkeit wichtige, N2-Bus (*unique sequence*) bzw. PEVK-Region. Die elastischere N2BA-Isoform enthält zusätzlich noch eine mittlere Ig-Domäne und eine N2A-Region. Modifiziert nach Bärthlein (2019).

Das Titin-Z-Banden-Segment, der N-Terminus, besteht aus verschiedenen Bindungen zu alpha-Actinin und ist somit integraler Bestandteil der Z-Scheibe und der Struktur des gesamten Sarkomers (Gregorio et al., 1998).

Die I-Banden-Region ist hauptsächlich für die elastischen Eigenschaften des Titins verantwortlich (Funatsu et al., 1993). Drei Strukturen innerhalb der I-Banden-Region bedingen diese Funktion (Linke et al., 1999):

- (1) Immunglobulin (Ig)- ähnliche Sequenzen (Linke et al., 1996, Trombitas et al., 1998);
- (2) Die sog. PEVK-Region, eine Sequenz, die reich an Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Valin (V)- und Lysin (K) ist (Labeit and Kolmerer, 1995);
- (3) Die sog. N2-B *unique sequence* Region (N2-Bus) (Linke et al., 1999).

Zusätzlich befindet sich in diesem I-Banden-Abschnitt bei der N2BA- und N2A-Isoform auch noch ein N2-A Element (Freiburg et al., 2000).

Die drei oben beschriebenen Protein-Elemente (1-3) dehnen sich bei steigender Vordehnung des Sarkomers in einer bestimmten Reihenfolge aus (Helmes et al., 1999, Trombitas et al., 1998). Bei geringen Kräften werden zuallererst die kurzen Verbindun-

gen zwischen den Ig-Domänen gestreckt. Im Folgenden wird dann mit steigender Kraft erst die PEVK-Region und dann die herzmuskelspezifische N2-Bus-Region ausgedehnt. Für die Elastizität bzw. Dehnbarkeit ist dabei vor allen Dingen das Streben nach größtmöglicher Entropie verantwortlich, also dem Streben nach einem energetisch möglichst günstigen Zustand. Dies bedeutet, dass zum Beispiel die Ig-Domänen im Ruhezustand geknäult sind und so durch eine Zugkraft in Längsrichtung des Proteins auseinander gezogen werden können (Linke et al., 1998b). Erst ab einer Sarkomerlänge von 2,4µm wird die PEVK-Region gedehnt, also bei einer deutlich höheren Vordehnung als die Ig-Domänen (Linke et al., 1998a). Wahrscheinlich herrschen in der PEVK-Region stärkere intermolekulare elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (Linke et al., 1998a).

Das A-Banden-Titin ist von seiner Struktur her weniger charakteristisch. Es enthält zum Großteil Ig- und Fibronectin-Typ III-Domänen und bildet dabei Superhelices (Labeit et al., 1992, Labeit and Kolmerer, 1995). Es bindet an Myosin und C-Protein (Labeit et al., 1992).

In der M-Banden-Region, die ebenfalls durch Ig-Domänen gekennzeichnet ist, befindet sich eine Kinase (Labeit et al., 1992). Die Titin-Kinase ist wahrscheinlich während der Myogenese und der Muskelregeneration von Bedeutung (Gautel, 2011).

1.1.1.2 Titinbasierte Modulation der Steifigkeit in der Herzmuskulatur

Die Modulation der Steifigkeit von Titin bzw. des myokardialen Sarkomers wird durch hauptsächlich drei bekannte Mechanismen bewerkstelligt. Dazu gehören:

- (1.) die translationale Veränderung der Isoformenzusammensetzung,
- (2.) die posttranslationale Bildung von Disulfidbrücken und
- (3.) die Phosphorylierung der N2-Bus und PEVK-Region.

Das Isoformen-Verhältnis von N2BA zu N2B hat direkten Einfluss auf die myokardiale Steifigkeit. Da die längere N2BA-Isoform weniger steif ist als die kürzere N2B-Isoform, ist somit Gewebe mit einem höheren N2BA-Isoformen-Anteil auch weniger steif. Das Isoformen-Verhältnis ändert sich dabei zum einen während der Muskelentwicklung eines Lebewesens, wie z.B. bei Ratten (Warren et al., 2004), und zum anderen bei pathophysiologischen Veränderungen des Herzens. So konnte gezeigt werden, dass das Myokard von Patient*innen mit Herzinsuffizienz einen erhöhten Anteil der weniger

steifen N2BA-Isoform enthielt, was hier als Anpassungsmechanismus an die fibrotische Versteifung des insuffizienten Myokards diskutiert wurde (Neagoe et al., 2002). Ebenfalls variiert das N2BA:N2B Verhältnis in Abhängigkeit von der Lokalisation. Im rechten Ventrikel ist das Verhältnis von N2BA:N2B größer als im linken Ventrikel (Neagoe et al., 2003). Im Myokard von adulten Ratten vom z.B. Typ Sprague-Dawley liegt der N2BA-Anteil allerdings nur bei etwa 15% (Cazorla et al., 2000, Warren et al., 2004). Deshalb sind geringfügige Änderungen der Isoformenzusammensetzung in diesem Gewebe experimentell nur sehr schwer darzustellen und werden daher für diese Arbeit außer Acht gelassen.

Eine weitere posttranslationale Modifikation der Steifigkeit ist die Bildung von Disulfidbrücken. Es wurde beobachtet, dass sich unter der Einwirkung von oxidativem Stress innerhalb der N2-Bus Disulfidbrücken zwischen benachbarten Ig-Sequenzen bilden und die Myofilamentsteifigkeit erhöhen (Grützner et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte allerdings auch beschrieben werden, dass die Disulfidbindung von exponierten Cystein-Resten mit Glutathion die Rückfaltung entfalteter Ig-Domänen verhindert und somit die passive Steifigkeit des Proteins herabsetzt (Alegre-Cebollada et al., 2014).

Weiterhin besitzt Titin eine Vielzahl von verschiedenen Phosphorylierungsstellen, die durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden können. Wichtige Domänen für die Veränderung der Titin-basierten Myofilamentsteifigkeit durch Phosphorylierung sind die PEVK-Region, die sowohl in Herz- als auch in der Skelettmuskel-Titin vorhanden ist, und die N2-Bus-Region, die nur in Kardiomyozyten exprimiert wird.

Die Theorie hinter der Beeinflussung von passiver Steifigkeit durch Phosphorylierung beruht auf der Annahme einer Persistenzlängenveränderung in der N2-Bus- und PEVK-Region (Rief et al., 1997, Linke and Grützner, 2008, Mártonfalvi and Kellermayer, 2014). Persistenzlänge ist ein Parameter, der die Krümmungssteifigkeit und statistische Segmentlänge eines Biopolymers, wie Titin eines ist, beschreibt. Zusammengefasst ist festzustellen: Je höher die Persistenzlänge, desto niedriger ist die benötigte Kraft ein Biopolymer zu dehnen. Schaut man sich nach diesem Prinzip die N2-Bus-Region mit einem erhöhten Phosphorylierungslevel an, dann fällt auf, dass dieses Segment durch viele negativ geladene Aminosäuren einen relativ niedrigen isoelektrischen Punkt hat (Kötter et al., 2013). Wird nun ein negativ geladener Phosphatrest in dieses negativ geladene Segment eingefügt, kommt es zu intramolekularer elektrostatischer Absto-

ßung. Diese bedingt dann eine erhöhte Persistenzlänge und damit wird eine geringere Kraft zum Ausdehnen des Moleküls benötigt (Krüger et al., 2009). In der PEVK-Region verhält sich dies auf Grund des höheren isoelektrischen Punktes genau umgekehrt, was die Erniedrigung der Persistenzlänge und damit die Erhöhung der Steifigkeit zur Folge hat (Hidalgo et al., 2009).

Die im Zuge der Steifigkeitsveränderung des Titins am besten untersuchten Phosphorylierungsstellen im elastischen I-Band-Teil sind die Serinreste (S) 4010 und 4099 in der N2-Bus-Region und S11878 und S12022 in der PEVK-Region (Abb.4). Diese vier genannten Serinreste sind evolutionär konserviert, was sie für die Untersuchung besonders wertvoll macht, da sie in vielen Arten gleichermaßen vorkommen (Hidalgo et al., 2009). Weiterhin besitzt Titin noch viele weitere Phosphorylierungsstellen (Abb.4) (Lundby et al., 2012, Huttlin et al., 2010).

Die herzspezifische N2-Bus-Region wird von der Proteinkinase A (PKA) (Kötter et al., 2013), der Proteinkinase G (PKG) (Krüger et al., 2009), der Extracellular-signal Regulated Kinases 2 (ERK2) (Raskin et al., 2012) und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase-II δ (CaMKII δ) phosphoryliert (Hamdani et al., 2013, Hidalgo et al., 2013).

Die PEVK-Region wird von der Proteinkinase C α (PKC α) (Hidalgo et al., 2009) und ebenfalls von der CaMKII δ phosphoryliert (Hamdani et al., 2013, Hidalgo et al., 2013).

Die Signalwege zur Aktivierung der genannten Kinasen sind gut verstanden. Beispielhaft werden folgend die für diese Arbeit relevanten Aktivierungswege und deren dazugehörigen Phosphorylierungsstellen beschrieben (Abb.4).

S4010 wird durch PKA (Kötter et al., 2013) und ERK2 phosphoryliert (Raskin et al., 2012). Die Aktivierung der PKA erfolgt über einen G_s-gekoppelten β -Adrenorezeptor. Das aktivierte G-Protein kann eine Adenyl-Cyclase binden und aktivieren. Diese wiederum formt Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches dann die PKA aktivieren kann.

Der ERK2-aktivierende Signalweg funktioniert ebenfalls über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. An diesem Rezeptor bindet z.B. Angiotensin II und aktiviert so den Mitogen-aktivierten Proteinkinase/ERK (MAPK/ERK)-Signalweg ERK2 (Raskin et al., 2012).

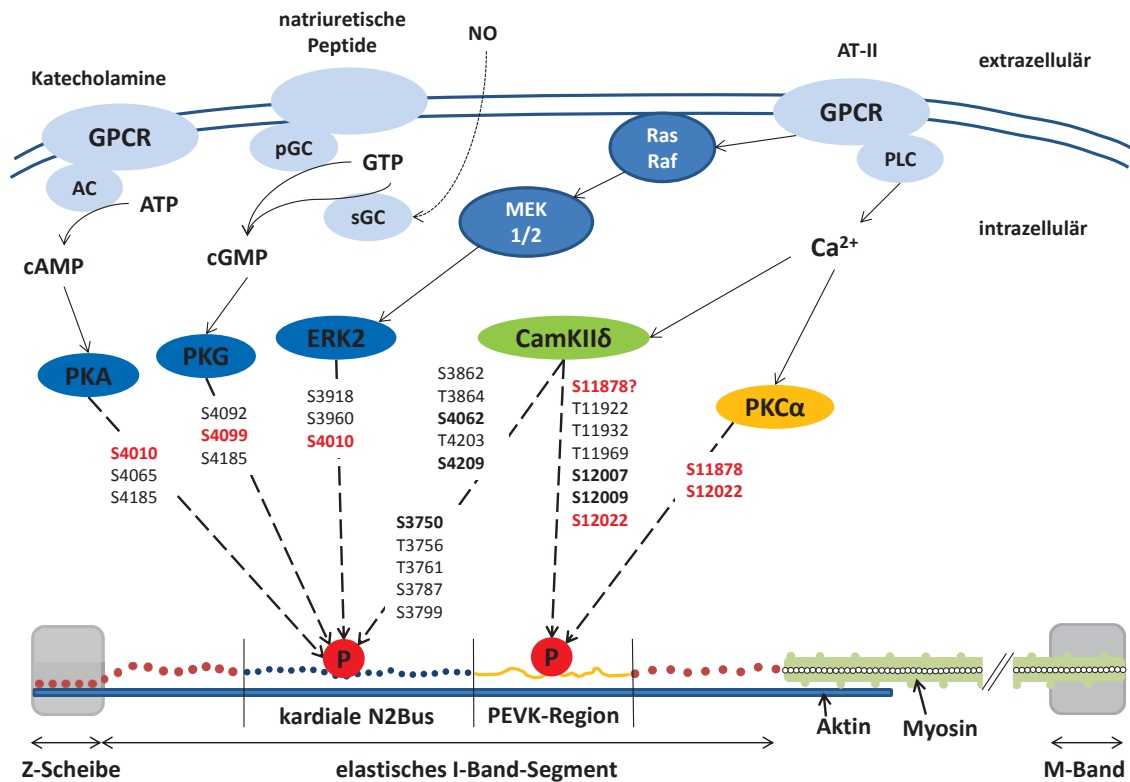


Abb.4: Darstellung der Titinphosphorylierungsstellen an N2-Bus und PEVK-Region mit den Kinase-Signalwegen. Die Phosphorylierungsstellen (P) wurden mit der kanonischen humanen Titin Sequenz identifiziert (UniProtKB identifier Q8WZ42-1). Fett gedruckt sind evolutionär konservierte Stellen. In roter Schrift und fett sind die in dieser Arbeit untersuchten Phosphorylierungsstellen. Adenylylzyklase (AC); Angiotensin II (AngII); Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase α ($\text{PKC}\alpha$); Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II δ ($\text{CaMKII}\delta$); cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA); cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG); Endothelin-1 (ET-1); Extrazellulär-Signal regulierte Kinase-II (ERK2); G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR); lösliche Guanylylzyklase (sGC); MAPK/ERK Kinase-1 und -2 (MEK1/2); N2-B Unique Sequence (N2-Bus); partikuläre Guanylylzyklase (pGC); Phospholipase C (PLC); Phosphorylierungsstelle (P); *Rat Fibrosarcoma Protein* (Raf); Ratten Sarcoma Protein (Ras); Stickstoffmonoxid (NO); Serinrest (S); Threoninrest (T); zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP); zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Modifiziert nach Linke and Hamdani (2014).

Die Phosphorylierung von S4099 hängt maßgeblich von PKG ab (Krüger et al., 2009). Die PKG wird über cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert. Das cGMP wird aus Guanosintriphosphat (GTP) über eine lösliche (Aktivierung durch NO) oder rezeptorabhängige (Aktivierung durch natriuretische Peptide) Guanylylcyklase geformt.

S11878 und S12022 in der PEVK-Region in humanem Herzgewebe werden von $\text{PKC}\alpha$ phosphoryliert (Hidalgo et al., 2009). $\text{PKC}\alpha$ wird dabei über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, z.B. α_1 -Rezeptor, und Phospholipase-C calciumabhängig aktiviert.

Für die $\text{CaMKII}\delta$ sind bisher die meisten Phosphorylierungsstellen identifiziert worden. In der PEVK-Region sind bislang die Serinreste 11878 und 12022 am besten charakteri-

siert. Die funktionelle Bedeutung der CaMKII δ -vermittelten Phosphorylierung von S11878 ist umstritten, da die Kinase auch in der N2-Bus-Region verschiedene Serinreste phosphoryliert und dadurch die Abnahme der passiven Myozytensteifigkeit induziert (Hamdani et al., 2013, Hidalgo et al., 2013).

Die Steifigkeit Titins wird maßgeblich durch die Phosphorylierung beeinflusst. In mechanischen Experimenten mit isolierten Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass erhöhte PKA- (Kötter et al., 2013), PKG- (Krüger et al., 2009), CaMKII δ - (Hamdani et al., 2013) und ERK2-Aktivität (Raskin et al., 2012) die passive Steifigkeit Titins herabsetzt. Im Gegensatz dazu führt die Phosphorylierung von S11878 und S12022 durch u.a. PKC α zu einer Erhöhung der passiven Myofilamentsteifigkeit (Hidalgo et al., 2009).

In Hinblick auf die Titin-Phosphorylierung und Herzentwicklung spielt für diese Arbeit der Insulin-Akt-PI3Kinase-mTor-Signalweg eine große Rolle (Abb.5) (Krüger et al., 2010). Insulin scheint u.a., ähnlich wie T3, für die embryonale Herzentwicklung eine zentrale Bedeutung zu haben (Belke et al., 2002). Bei Knock-Out-Mäusen ohne Insulinrezeptor ist nicht nur der Glucosestoffwechsel verändert, sondern auch die Herzgröße um 20-30% geringer als bei den Kontrolltieren (Belke et al., 2002). Weiterhin beeinflusst Insulin das Isoformenverhältnis bzw. den Shift von fetalen zu adulten Titin-Isoformen und den Phosphorylierungsstatus (Krüger et al., 2010).

Das Titin-Isoformenverhältnis wird dabei maßgeblich über den *splicing*-Faktor RNA *binding motif* 20 (RBM20) gesteuert, der mit dem PI3K-Akt-mTOR-Weg verknüpft ist (Zhu et al., 2017). Insulinbehandlung von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führte zu einem erhöhten N2B-Anteil und einem erhöhten RBM20-Level (Zhu et al., 2017).

Außerdem wurde gezeigt, dass Insulin das Phosphorylierungslevel von beiden kardialen Titin Isoformen erhöht (Krüger et al., 2010). Dafür könnte eine sog. *Pro-Survival*-Signalkaskade über PI3K, NO-Synthase und PKG verantwortlich sein (Abb.5) (Abdallah et al., 2006, Zeng et al., 2000). Weiter aktiviert Insulin den mTOR/riCTOR-Komplex, der mit der Aktivierung von PKC α in Zusammenhang steht (Sarbasov et al., 2004). Folglich hat der absolute Insulinmangel des hier verwendeten Tiermodells vermutlich einen großen Einfluss auf die Titin-Phosphorylierung und damit einhergehend auf die Myofilamentsteifigkeit (Abb.5).

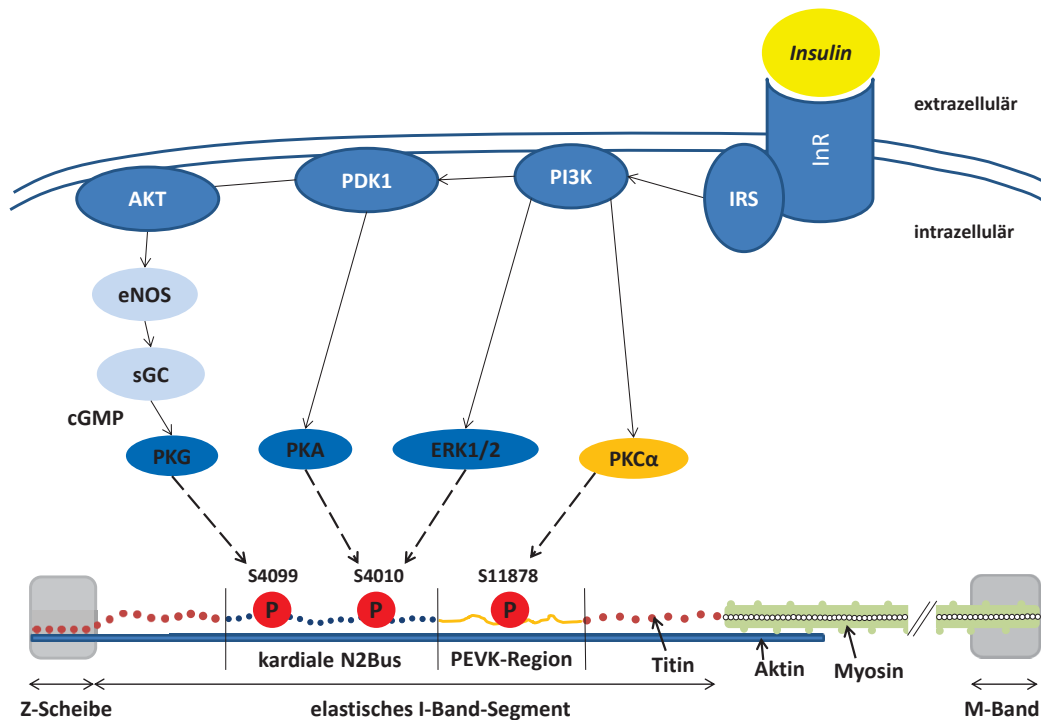


Abb.5: Darstellung der insulin-gesteuerten Phosphorylierung von Titin. Gezeigt werden die Phosphorylierungsstellen (P) für die Serinreste (S) 4010, 4099 und 11878 für die bisher nachgewiesen wurde, dass Insulin über verschiedene Proteinkinasesignalwege das Phosphorylierungslevel erhöht. Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS); Extrazellulär-Signal regulierte Kinase-1/2 (ERK1/2); Insulin-Rezeptor (InR); Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS); lösliche Guanylylzyklase (sGC); *phosphoinositide*-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1); *phosphoinositide* 3-Kinase (PI3K); Proteinkinase A (PKA); Proteinkinase B (AKT); Proteinkinase C α (PKC α); Proteinkinase G (PKG); Phosphodiesterase 5 (PDE5); zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Modifiziert nach Hopf et al. (2018).

1.1.1.3 Rolle von Titin bei pathophysiologischen Veränderungen in der Herzmuskulatur

Es gibt viele verschiedene Faktoren, die die myokardiale Steifigkeit beeinflussen können. Die zwei Hauptkomponenten sind dabei Kollagen und Titin. Es hat sich herausgestellt, dass im physiologischen Sarkomerlängenbereich Titin maßgeblich für die Modifikation der passiven Steifigkeit auf Sarkomerebene verantwortlich ist und Kollagen meist erst bei größeren Sarkomerlängen an Bedeutung gewinnt (Granzier and Irving, 1995).

Daraus resultiert nun die Frage, welche Effekte steifere oder weniger steife Herzmuskulatur hat bzw. welche pathophysiologischen Prozesse mit einer Veränderung der passiven Steifigkeit einhergehen. Grundsätzlich muss man dabei wieder zwei Mechanismen unterscheiden.

Ein Mechanismus ist das alternative *splicing*, welches die Isoformen-Zusammensetzung bestimmt. RBM20 scheint dabei als *splicing*-Faktor eine wichtige Rolle zu spielen (Guo et al., 2018). Verschiedene pathophysiologische Prozesse führen dazu, dass ein größerer Anteil der elastischeren N2BA-Isoform ausgeprägt ist wie z.B. bei der ischämischen Kardiomyopathie (Neagoe et al., 2002), nicht-ischämischen dilatativen Kardiomyopathie (Makarenko et al., 2004) und *heart failure with reduced ejection fraction* (HFrEF) (Borbely et al., 2009). Umgekehrt verhält sich dies bei Hypertension in einem Hundemodell (Shapiro et al., 2007). Es gibt also starke Hinweise darauf, dass bei dekompensierter Herzinsuffizienz der elastischere N2BA-Anteil zunimmt, um eventuell erhöhte myokardiale Steifigkeit durch Fibrosierung zu kompensieren (Neagoe et al., 2002, Makarenko et al., 2004). Allerdings konnten Kötter et al. (2013) zeigen, dass bei gleicher Isoformenzusammensetzung in insuffizientem und suffizientem humanem Herzgewebe die myokardiale Steifigkeit bei Myopathien dennoch erhöht ist (Kötter et al., 2013). Folglich ist die Isoformenkomposition nur ein Mechanismus der Regulation der passiven Steifigkeit.

Dies lässt den Fokus auf die posttranslationale Modifikation der Steifigkeit wandern. Diese läuft im Allgemeinen viel schneller ab als die translationale Modifikation. Hervorzuheben ist hier besonders die Phosphorylierung der Titin-N2-Bus und PEVK-Region. An humanem Spendergewebe wurde gezeigt, dass bei Herzinsuffizienz die Steifigkeit der Myofilamente erhöht ist und die N2-Bus weniger phosphoryliert und die PEVK-Region erhöht phosphoryliert vorliegt (Kötter et al., 2013).

Diese geschilderten Zusammenhänge laufen alle auf die diastolische Dysfunktion als pathophysiologisches Geschehen hinaus. Durch die erhöhte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten wird die Füllung des linken Ventrikels erschwert. Das physiologische Korrelat ist hier die längenabhängige Aktivierung des Myokards, der Frank-Starling-Mechanismus. Nach diesem Prinzip ist die Vordehnung bzw. die Optimierung der Überlappung der Myofilamente entscheidend für die Auswurfleistung des Herzens. Bis zu einem gewissen Grad gilt: Je größer die Vordehnung, desto größer die Auswurfleistung und damit auch das ausgeworfene Volumen. Der Mechanismus ermöglicht es dem Herzen, auf eine Veränderung der Vorlast flexibel zu reagieren. Titin spielt in diesem Mechanismus eine maßgebliche Rolle (Fukuda et al., 2001, Konhilas et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es viele Hinweise gibt, dass Titin im Herzen die diastolische Funktion durch veränderte Steifigkeit durch Phosphorylierung maßgeblich beeinflusst.

1.1.2 Skelettmuskulatur

1.1.2.1 Unterschiede im Aufbau zur Herzmuskulatur

Die Skelettmuskulatur gehört ebenfalls zur Gruppe der quergestreiften Muskulatur. Dabei besteht ein Muskel aus vielen Muskelfasern, die jeweils einer polyploiden Muskelzelle entsprechen. Im Gegensatz zur Herzmuskulatur sind die einzelnen Fasern streng parallel angeordnet und nicht durch *gap junctions* miteinander verbunden. Jede Faser besteht aus vielen hundert Myofibrillen, die wiederum eine Aneinanderreihung von Sarkomeren sind. Die Eigenschaften der Skelettmuskulatur hängen sehr von dem jeweils ausgebildeten Fasertyp ab. Dabei wird die Unterteilung in der Literatur anhand der Isoformen der schweren Myosinketten (*myosin heavy chain* (MHC)) gemacht. Im Menschen sind hauptsächlich die langsam-kontrahierenden Typ 1 Fasern und die schnell-kontrahierenden Typ 2a und Typ 2x Fasern zu finden. Typ 1 Fasern haben viele Mitochondrien und sind eher für aerobe Ausdauerbelastungen ausgelegt (Sullivan and Pittman, 1987), während Typ 2 Fasern eher für die Maximalkraftentwicklung und anaerobe Belastungen von Bedeutung sind (Malisoux et al., 2006, Widrick et al., 2002). Bei Untrainierten ist das Verhältnis von Typ 1 zu Typ 2 Fasern im z.B. Musculus gastrocnemius ausgeglichen bei 50:50, während es bei professionellen Athlet*innen einen Shift zum jeweils vorteilhaften Faser-Typ gibt, je nachdem ob eine Schnellkraft oder Ausdauerleistung gefragt ist (Costill et al., 1976). Es scheint so zu sein, dass der Isoformenshift der MHC von Typ 1 zu Typ 2 in gewissem Maße möglich ist (Widrick et al., 2002). Ratten haben zusätzlich noch eine Typ 2b Isoform der MHC (Liu et al., 2009). Die jeweilige MHC-Isoformenzusammensetzung kann nicht nur von Skelettmuskel zu Skelettmuskel, sondern auch innerhalb einzelner Regionen im Muskel oder sogar innerhalb einer Muskelfaser variieren (Punkt, 2002, Staron and Pette, 1987).

Der dominante Fasertyp im humanen Musculus psoas ist Typ 2a (Arbanas et al., 2009), während bei Ratten Typ 2b dominant ist (Vlahovic et al., 2017). Da der Musculus quadriceps femoris aus verschiedenen Anteilen besteht, wundert es nicht, dass es sowohl bei Ratten als auch bei Menschen sehr auf die Lokalität des untersuchten Muskelge-

webes ankommt, welcher Fasertyp dominant ist (Kohn and Myburgh, 2007, Staron et al., 2000).

Auf Sarkomerebene funktionieren Skelettmuskeln wie die Herzmuskulatur auch. Die aktive Kontraktion wird durch den Querbrückenzyklus herbeigeführt. Unterschiede gibt es allerdings in den Ausprägungen der Isoformen der einzelnen Proteine.

1.1.2.2 Titinbasierte Modulation der Steifigkeit in der Skelettmuskulatur

Es gibt erste Hinweise darauf, dass die titinbasierte Steifigkeit in der Skelettmuskulatur durch ähnliche Mechanismen wie in der Herzmuskulatur moduliert wird (Hidalgo et al., 2014, Müller et al., 2014, van Hees et al., 2012). Allerdings spielt hier die Zusammensetzung der Titin-Isoformen eine untergeordnete Rolle, da in den verschiedenen Skelettmuskeln jeweils nur eine Titin N2A Isoform in einer Größe zwischen 3300-3600kDa exprimiert wird (Li et al., 2012, Neagoe et al., 2003). Da sich die verschiedenen Titin-Isoformen hauptsächlich in der Länge und Zusammensetzung der elastischen I-Band Region unterscheiden, sind Muskelfasern mit längeren Isoformen in der Regel weniger steif als solche mit kürzeren Isoformen (Prado et al., 2005). So ist auch die passive Steifigkeit in schnell-kontrahierenden Typ 1 Fasern mit kürzeren Isoformen höher als in langsam-kontrahierenden Typ 2 Fasern, die längere Isoformen exprimieren (Mutungi et al., 2003). Generell sind Skelettmuskelfasern elastischer als die Herzmuskelfasern (Linke et al., 1996, Li et al., 2012, Mutungi et al., 2003). Da die skelettale N2A Isoform keine N2-Bus enthält, entfällt auch die Modifikation dieser. Auf molekularer Ebene wird die passive Steifigkeit von Titin somit hauptsächlich durch Phosphorylierung der PEVK-Region reguliert (Abb.6).

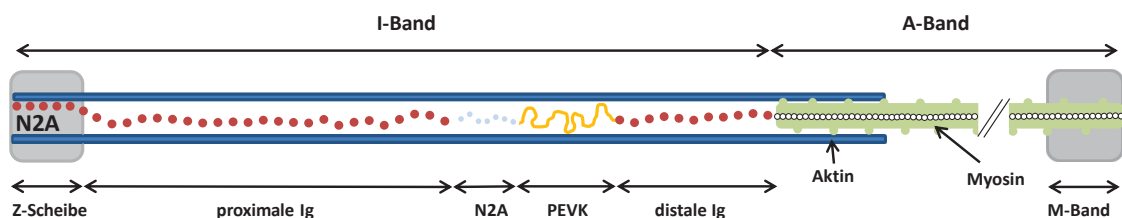


Abb.6: Schematische Darstellung der im Skelettmuskel befindlichen Titin-N2A-Isoform. Dargestellt ist der Aufbau der N2A-Isoform im Halbsarkomer zwischen Z-Scheibe und M-Band. Innerhalb des I-Band liegen verschiedene Subeinheiten, wie die proximale und distale Ig(Immunglobulin-ähnliche)-Domäne, der N2A-Teil und die für die passive Steifigkeit wichtige PEVK-Region.

Auch in der Skelettmuskulatur hat Titin dabei eine kontrovers diskutierte Rolle in der Stabilisierung des Sarkomers, wie auch in der aktiven und passiven Kraftentwicklung

(Herzog, 2018, Freundt and Linke, 2019). So konnte gezeigt werden, dass in mit Calcium aktivierten Muskeln die passive Steifigkeit höher lag als in passiven Muskeln (Labeit et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Calcium dabei besonders an Glutamat in der PEVK-Region bindet (Labeit et al., 2003). Außerdem gibt es Bindungen zwischen Titin und Aktin innerhalb der PEVK-Region, die Einfluss auf die Sarkomerfunktion nehmen (Nagy et al., 2004).

Es zeigen sich viele verschiedene Mechanismen, die einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften Titins in der Skelettmuskulatur haben. In dieser Arbeit wird das Augenmerk allerdings auf dem Einfluss der Titin-Phosphorylierung als möglicher Modulationsmechanismus für die passive Steifigkeit von Skelettmuskulatur liegen.

1.2 Diabetes mellitus

1.2.1 Allgemein/Ätiologie/Pathogenese/Diagnostik

Bei Diabetes mellitus handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen, die auf einer Störung der Insulinproduktion bzw. -wirkung beruht. Durch die verminderte Aufnahme von Glucose in die Zellen kommt es zu einer Hyperglykämie, die das Leitsymptom darstellt. Die Diagnose kann anhand von verschiedenen Parametern gestellt werden. Ein Nüchternblutzucker $\geq 126\text{mg/dl}$ nach 8 stündiger Nahrungskarenz, ein Blutzuckerwert $\geq 200\text{mg/dl}$ mit typischen Symptomen der Hyperglykämie oder ein HbA1c-Wert von $\geq 6,5\%$ definieren unter anderem die manifeste Diabetes mellitus Erkrankung (American Diabetes Association, 2017). Der HbA1c-Anteil beschreibt dabei den Anteil des glykieren Hämoglobins und eignet sich besonders gut für die längerfristige Kontrolle der Blutzuckereinstellung.

Der anhaltend überhöhte Blutzuckerspiegel und der durch die verminderte Glucoseaufnahme in die Zelle verursachte Substratmangel haben weitreichende metabolische Folgen.

1.2.2 Übersicht Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus Typ 2 (=T2DM) geht pathophysiologisch auf eine Insulinresistenz zurück. Diese entwickelt sich meist auf der Basis einer „genetisch bedingten, multifaktoriellen Krankheitsbereitschaft“ (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2014). Besondere Risikofaktoren sind Übergewicht und Bewegungsmangel (American Diabetes Association, 2017). Anfänglich handelt es sich dabei um einen relativen Insulinmangel.

Die Insulinproduktion in den β -Zellen des Pankreas funktioniert noch, während die Insulinrezeptor-Sensibilität durch dauerhafte Überstimulation abnimmt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung entwickelt sich dann auch eine Insulinproduktionsstörung, die schließlich einen absoluten Insulinmangel bedingt. Die genaue Ätiologie ist dabei noch nicht bis ins Detail bekannt.

T2DM betrifft ca. 96 % aller Diabetiker*innen und hauptsächlich Menschen ab dem 50. Lebensjahr (Goffrier et al., 2017). Die Erkrankung entwickelt sich meist langsam. Problematisch dabei ist, dass erhöhte Glucosewerte im Blut anfänglich kaum oder keine Symptome verursachen. Somit wird die Diagnose häufig erst beim Eintritt direkter Folgeerscheinungen der Hyperglykämie gestellt. Polydypsie und Polyurie sind dabei typische Erstsymptome. Das Risiko für mikro- und makroangiopathische Ereignisse ist deutlich erhöht. Typische Begleit- und Folgeerkrankungen sind: Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, koronare Herzkrankheit sowie die diabetischen Neuro-, Nephro- und Retinopathie u.a. (Zheng et al., 2018).

An T2DM erkrankte Patient*innen profitieren in erster Linie von einer Lebensstiländerung hin zu Gewichtsreduktion, regelmäßigem Ausdauersport und einer gesunden Ernährung mit der Vermeidung von der Aufnahme zu vieler freier Kohlenhydrate. Zur medikamentösen Ergänzung stehen verschiedene orale Antidiabetika zur Verfügung, wobei Metformin bislang als Substanz der ersten Wahl gilt. Sollte die Hyperglykämie mit diesen therapeutischen Optionen weiter bestehen, kann man u.a. auf eine Insulintherapie zurückgreifen (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2014).

Der Einfluss von Diabetes auf die Funktion des Herzens und speziell die Herzmuskulatur ist vielschichtig. Klar ist, dass Patient*innen mit Diabetes Typ 2 ein deutlich erhöhtes Risiko haben an einer Herzinsuffizienz zu erkranken (Nichols et al., 2004). Gerade die diastolische Dysfunktion ist ein großes Problem bei ca. 60% der Typ 2 Diabetiker*innen (Poirier et al., 2001). Diese tritt meist noch vor einer systolischen Funktionseinschränkungen ein (Raev, 1994). Auf zellulärer Ebene konnte festgestellt werden, dass bei Patient*innen mit T2DM die myokardiale Steifigkeit zunimmt (van Heerebeek et al., 2008).

1.2.3 Übersicht Diabetes mellitus Typ 1

Bei Diabetes mellitus Typ 1 (=T1DM) handelt es sich um eine Erkrankung, die durch einen absoluten Insulinmangel hervorgerufen wird. T1DM tritt im Gegensatz zu T2DM fast immer im Jugend- oder Kindesalter auf. Verursacht wird diese Erkrankung meist durch autoimmunologische Prozesse, die die insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas zerstören (Bottazzo et al., 1974). Da so die insulinvermittelte Glucoseaufnahme in die Zellen immer weiter abnimmt, steigt der Glucosegehalt des Blutes an. Dies führt dazu, dass der Energiestoffwechsel zunehmend von Glycolyse auf Lipolyse umschwenkt und vermehrt Ketonkörper entstehen. Dabei kommt es in der stärksten Ausprägung zur Entwicklung einer sog. diabetischen Ketoazidose bis hin zum ketoazidotischen Koma. Die Feststellung einer diabetischen Ketoazidose ist ein medizinischer Notfall und häufiger Ausgangspunkt für die Diagnosestellung von T1DM (Johnson et al., 1980).

Die Ätiologie der Erkrankung ist multifaktoriell, allerdings besteht eine genetische Prädisposition durch bestimmte *Human-Leukocyte-Antigen*-Typen (Cordell and Todd, 1995).

Die Bedeutung von diabetischen Erkrankungen ist gesellschaftlich, volkswirtschaftlich und sozial von allergrößter Bedeutung. So ist ihre Gesamtprävalenz in Deutschland von 2009 bis 2015 von 8,9 auf 9,8% gestiegen (Goffrier et al., 2017). T1DM hatte dabei 2015 eine Prävalenz von 0,28% in Deutschland (Goffrier et al., 2017). Allerdings steigt gerade in Europa die T1DM-Inzidenz um jährlich ca. 3-4 % (Patterson et al., 2012). Wobei es innerhalb Deutschlands und Europas zum Teil große Unterschiede gibt (Goffrier et al., 2017). In Schweden und Finnland sind dabei die höchsten Inzidenzen mit 47 bis mehr als 60/100.000/Jahr zu verzeichnen (Tuomilehto, 2013). Dadurch kommt T1DM eine wachsende Bedeutung als chronische Erkrankung im Kindesalter bzw. Jugendalter zu, die sich auf das ganze zukünftige Leben der Betroffenen auswirkt. Dies hat zur Folge, dass auch weiterhin Grundlagenforschung nötig ist, um die Konsequenzen und Pathomechanismen dieser Erkrankung zu verstehen und den Folgeerscheinungen des Insulinmangels und der Hyperglykämie vorzubeugen.

T1DM ist fast immer insulinpflichtig, da meist keine ausreichende Restaktivität der Insulinproduktion im Pankreas zur Verfügung steht, die durch orale Antidiabetika verstärkt werden könnte. Wichtig dabei ist, dass der Blutglucosespiegel laufend kontrol-

liert und der HbA1c-Wert als Langzeitmarker im jeweiligen Referenzbereich gehalten wird. So kann das Risiko für Folgeschäden möglichst klein gehalten werden (Haak et al., 2020). Eine weitere wichtige Rolle spielen Schulungen, der meist jungen Patient*innen und der deren Familien, um die Blutzuckerschwankungen möglichst gering zu halten. So führt sehr kohlenhydratreiche Ernährung eher zur Hyperglykämie, die auf Dauer zu verschiedenen Folgeerkrankungen führt. Hohe körperliche Belastungen können dagegen eine akut lebensbedrohliche Hypoglykämien auslösen (Haak et al., 2020). Die Patient*innen müssen also ihren Lebensstil der Krankheit anpassen, um möglichst komplikationsfrei zu bleiben.

1.2.4 Folgeerkrankungen - allgemein

Bei den Folgeerkrankungen von T1DM muss man zunächst zwischen akuten und chronischen Geschehen unterscheiden. Bei T1DM beruhen die akuten Komplikationen auf einem Insulinmangel oder einer iatrogenen Insulinüberdosierung. Eine Insulinüberdosierung kann zu einer Hypoglykämie führen, die im hypoglykämischen Koma enden kann. Im Gegensatz dazu sind die diabetische Ketoazidose und das hyperosmolare hyperglykämische Syndrom auf einen Insulinmangel zurückzuführen.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den chronischen Folgeerkrankungen, die sich bei T1DM und T2DM stark ähneln, da sie meist in Zusammenhang mit einer chronischen Hyperglykämie beobachtet werden. Hauptsächlich zu nennen sind dabei die periphere und autonome Neuropathie, die diabetische Nephropathie, Retinopathie und Herz-Kreislaufkrankungen (Zheng et al., 2018). Die Mortalitätsrate von Menschen mit T1DM ist gegenüber der Normalbevölkerung in den letzten Jahren zwar rückläufig, aber dennoch deutlich erhöht. Dabei erhöhen vor dem 30. Lebensjahr vor allem akute Komplikationen die Sterblichkeit, während nach dem 30. Lebensjahr kardiovaskuläre Erkrankungen führend sind (Gagnum et al., 2017).

1.2.5 Folgeerkrankungen - diabetische Kardiomyopathie

Diese Arbeit konzentriert sich hauptsächlich auf die diabetische Kardiomyopathie und ihre pathophysiologischen Hintergründe. Geprägt wurde der Begriff der diabetischen Kardiomyopathie dadurch, dass u.a. in der groß angelegten Framingham-Studie Herzversagen bei Diabetiker*innen nicht allein durch koronare Herzkrankheit und Hypertension erklärt werden konnte (Kannel and McGee, 1979, Rubler et al., 1972). Die *Eu-*

European Society of Cardiology definiert die diabetische Kardiomyopathie als klinische Diagnose der ventrikulären Dysfunktion, ohne koronare Artherosklerose und Hypertension (ESC Committee et al., 2013). Dies ist auf eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen zurückzuführen, wie zum Beispiel eine Fibrosierung, Hypertrophie und erhöhte myokardiale Steifigkeit des Herzgewebes. Zwar ist die aktuelle Studienlage bezüglich des Auftretens einer diabetischen Kardiomyopathie bei T1DM noch nicht völlig eindeutig (Hölscher et al., 2016), ein Zusammenhang zwischen T1DM und diabetischer Kardiomyopathie wird jedoch diskutiert (Lind et al., 2011, Rosengren et al., 2015). Studien deuten darauf hin, dass sich schon früh nach Beginn der T1DM Erkrankung als Hinweis auf eine diabetischen Kardiomyopathie eine diastolische Dysfunktion manifestiert (Schannwell et al., 2002).

Die diastolische Dysfunktion wird dabei häufig funktionell mit *heart failure with preserved ejection fraction* gleichgesetzt (Paulus et al., 2007). Die Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels ist bei diesen Patient*innen mit normaler bzw. erhaltener Ejektionsfraktion erniedrigt (Zile et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass auf molekularer Ebene die Ruhesteifigkeit des Sarkomers verändert ist.

Im Gegensatz dazu scheint sich die Pathophysiologie hinter der systolischen Dysfunktion eher von erhöhter Fibrosierung und dem Anfall von *advanced glycation endproducts* abzuhängen (van Heerebeek et al., 2008). Dabei ist die Mortalität beim Auftreten einer diastolischer Dysfunktion genauso wie bei systolischer Dysfunktion im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöht (Wang et al., 2003).

Wie bereits beschrieben gibt es mehrere Mechanismen, die die passive Steifigkeit von Kardiomyozyten verändern. Ein Protein, was hauptsächlich für die Ruhesteifigkeit auf Sarkomerebene und auch für diabetes-induzierte Veränderungen verantwortlich sein könnte, ist Titin. Wie bereits unter 1.1.1.2. beschrieben kann Titin die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten zum einen durch einen Isoformen-*switch* von der steiferen N2B-Isoform hin zur längeren und weniger steifen N2BA-Isoform beeinflussen. Zum anderen kann die Titin-Elastizität auch durch dynamische Phosphorylierung der elastischen I-Banden Region (N2-B *unique sequence* und PEVK) geändert werden. Auf beide Mechanismen hat Insulin, vermutlich über den PI3K/AKT-Signalweg (Abb.5), einen wichtigen Einfluss (Krüger et al., 2010). Die beteiligten Mechanismen unterscheiden sich dabei vermutlich zwischen T1DM und T2DM. Denn T1DM Patient*innen entwi-

ckeln sowohl eine diastolische und als auch eine systolische Dysfunktion. Wohingegen die meisten T2DM Patient*innen bei erhaltener systolischer Funktion, zunächst eine diastolische Dysfunktion entwickeln (van Heerebeek et al., 2008).

1.2.6 Folgeerkrankungen - diabetische Myopathie

Diabetes mellitus hat auf die Skelettmuskulatur eine Vielzahl von Auswirkungen, die sich gemeinhin unter dem Begriff der diabetischen Myopathie zusammenfassen lassen. Myopathie heißt Muskelleiden. Das Leitsymptom einer Myopathie ist die Muskelschwäche. Die diabetische Myopathie ist also eine durch Diabetes mellitus verursachte Muskelschwäche der quergestreiften Skelettmuskulatur.

Die meisten Untersuchungen zur diabetischen Myopathie und ihren Auswirkungen auf das Leben der Patient*innen wurden an älteren Menschen mit T2DM vorgenommen. Objektivierbar ist, dass ältere Menschen mit T2DM an einem Verlust ihrer Muskelmasse leiden (Park et al., 2009). Außerdem haben Typ 2 Diabetiker*innen eine geringere Muskelkraft in Abhängigkeit vom chronischen Maße ihrer Hyperglykämie (Park et al., 2006). Diese Erkenntnisse konnten auch in Korrelation mit Lauftests belegt werden. Volpato et al. (2012) zeigten, dass ältere Menschen (>65 Jahre) mit Diabetes mellitus im Durchschnitt deutlich langsamer in Lauftests über 4 und 400m waren und dies in direktem Zusammenhang mit einer geringeren Muskeldichte und –masse gebracht werden konnte. Insgesamt sind Menschen mit über 60 Jahren mit T2DM in ihrer funktionellen körperlichen Aktivität deutlich eingeschränkt (Kalyani et al., 2010). Dadurch erhöht sich ihr Risiko für Stürze, Hospitalisation und Verlust der Selbstständigkeit (Fried and Guralnik, 1997).

Zum Zusammenhang von T1DM und diabetischer Myopathie gibt es bisher wenige Erkenntnisse. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sowohl chronische, als auch akute Hyperglykämie deutliche Auswirkungen auf die Funktion der Skelettmuskulatur haben. So führt zum Beispiel akute Hyperglykämie zu einer Abnahme der isometrischen Muskelkraft bei Patient*innen mit T1DM (Andersen et al., 2005). Dagegen konnte eine andere Untersuchung zeigen, dass chronische Hyperglykämie einen positiven Einfluss auf die Beinmuskelausdauerleistung bei gleichzeitigem Kraftverlust bei T1DM Patient*innen hatte (Andersen, 1998).

Als pathophysiologische Grundlagen der diabetischen Myopathie werden einige Ursachen diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Hyperglykämie, Neuropathie, muskuläre Fettinfiltrationen und inflammatorische Prozesse auf die Muskelfunktion bei Diabetiker*innen negativ auswirken (Wang and Hazuda, 2011, McDermott et al., 2004, Miljkovic-Gacic et al., 2008, Kuo et al., 2011). Im Detail bestehen allerdings hier noch viele offene Fragen.

Insgesamt stellt Insulin einen wichtigen Regulator in der Skelettmuskulatur dar, der sich positiv, sowohl auf die mitochondriale ATP-Produktion, als auch auf die mRNA Transkription und Proteinproduktion auswirkt (Stump et al., 2003). Bei T1DM und T2DM Patient*innen ist unter Insulinmangel die mitochondriale ATP Produktion deutlich vermindert (Karakelides et al., 2007, Mogensen et al., 2007). In der Skelettmuskulatur wird die Glucoseaufnahme hauptsächlich über den insulinabhängigen GLUT4 reguliert. Dadurch haben Erkrankungen des diabetischen Formenkreises hier einen großen Einfluss auf den Metabolismus und die Funktion. In T2DM Patient*innen ist die Dichte von GLUT4 auf Typ 1 Muskelfasern signifikant herabgesetzt (Gaster et al., 2001). Hyperglykämie und Insulinmangel im Rahmen von T1DM stellen somit einen wichtigen Faktor für eine metabolische Dysbalance in Skelettmuskelgewebe dar, der die beschriebenen Funktionseinschränkungen bedingen könnte.

1.2.7 Streptozotozin behandelte Ratten als Diabetes mellitus Typ 1 Modell

Das Antibiotikum Streptozotozin (STZ) ähnelt in seiner Struktur Glucose und wird vor allem vom GLUT2 Glucosetransporter in die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas aufgenommen (Schnedl et al., 1994). Dies führt zur Nekrose der β -Zellen (Bonnevie-Nielsen et al., 1981). Durch das entstandene Insulindefizit kommt es zur Hyperglykämie und weiteren typischen T1DM bedingten metabolischen Folgeerscheinungen (Islas-Andrade et al., 2000). Die STZ-Behandlung ist eine häufig verwendete Methode, um T1DM zu simulieren. Sie ist verhältnismäßig einfach anzuwenden, da sie keiner gentechnischen Behandlung der Versuchstiere bedarf, um die Auswirkungen von absolutem Insulinmangel und folgender Hyperglykämie zu untersuchen. Allerdings gibt es auch Kritik an dem Modell, da STZ nachgewiesenermaßen nicht nur selektiv auf die β -Zellen des Pankreas wirkt, sondern auch direkten Einfluss auf andere Gewebe hat (Krause et al., 2009). Bei aller Kritik zeigt sich trotzdem auch, dass die Folgeerscheinungen

nungen einer STZ-Behandlung denen einer Diabetes mellitus Erkrankung sehr ähneln. Es gibt viele Anzeichen dafür, dass sowohl diabetische Myopathie und Kardiomyopathie im STZ-Modell, als auch beim Menschen zu finden sind (Litwin et al., 1990, Akula et al., 2003, Krüger et al., 2010, Sanchez et al., 2005, Lesniewski et al., 2003).

1.3 Ziele der Arbeit

Die Inzidenzen von T1DM und T2DM sind ansteigend. Somit werden die aus Diabetes mellitus entstehenden Folgeerkrankungen immer größere soziale und gesundheitsökonomische Dimensionen erreichen. Speziell die Pathophysiologie der diabetischen Kardiomyopathie, die mit einer erhöhten Muskelsteifigkeit und einer diastolischen Dysfunktion einhergeht, ist bisher noch nicht gut verstanden (van Heerebeek et al., 2008). Von zentraler Bedeutung für die passive Muskelsteifigkeit ist dabei das Sarkomerprotein Titin. Es wird davon ausgegangen, dass auf molekularer Ebene Modifikationen des Titin-Proteins stattfinden, die die erhöhte passive Steifigkeit mitverursachen. Ein wichtiger Mechanismus zur Veränderung der passiven Steifigkeit ist die Phosphorylierung der Titin-N2-Bus und -PEVK-Region. Dabei erhöht die Phosphorylierung der PEVK-Region die passive Steifigkeit. In der herzspezifischen N2-Bus wird sie durch Phosphorylierung vermindert. Die resultierende Hypothese ist, dass in den diabetischen STZ-Ratten die Phosphorylierung der untersuchten Serinreste in der PEVK-Region erhöht und/oder in der N2-Bus vermindert ist.

Da in der Herzmuskulatur im Falle von T1DM von einer veränderten Phosphorylierung auszugehen ist, ist die Hypothese für die untersuchten Skelettmuskeln, dass auch hier die Phosphorylierung in der Titin-PEVK-Region unter dem Einfluss von T1DM verändert ist. Die N2-Bus spielt hier keine Rolle, da sie nur in Kardiomyozyten vorkommt.

Entsprechend der vermutlich veränderten Phosphorylierung Titins in der Skelett- und Herzmuskulatur müssten sich auch Veränderungen in den untersuchten Signalwegen zeigen, über die die Phosphorylierung der untersuchten Serinreste gesteuert wird.

Untersucht wird, ob sich die Phosphorylierung der Titin-Isoformen in Herz- und Skelettmuskulatur unter dem Einfluss von unbehandeltem Diabetes mellitus Typ 1 ändert. Als Modell werden dabei mit STZ behandelte, diabetische, weibliche, adulte 20 Wochen alte Ratten, mit entsprechenden nicht behandelten weiblichen Kontrolltieren verglichen. Die analysierten Proben werden jeweils aus dem linken Ventrikel, Musculus

quadriceps femoris und Musculus psoas entnommen. Exemplarisch wird dafür die relative Phosphorylierung der Serinreste 4010, 4099 (N2-Bus-Region) und der Serinreste 11878, 12022 (PEVK-Region) gemessen. Diese genannten Serinreste sind evolutionär konserviert, also in den meisten Säugetieren vorhanden, und haben nachgewiesenermaßen einen Einfluss auf die Steifigkeit des Sarkomers. Außerdem werden entsprechende Proteine der Signalwege exemplarisch auf ihre Phosphorylierungslevel überprüft. Die Phosphorylierungslevel werden per Western Blot und Antikörpermarkierung gemessen.

Durch die Experimente wird ein Hinweis auf den Einfluss von dauerhafter Hyperglykämie und Insulinmangel im Rahmen von Diabetes mellitus Typ 1 auf die Phosphorylierung von Titin in der Herz- und Skelettmuskulatur erwartet. Diese könnten dann einen Hinweis auf die etwaig veränderte passive Steifigkeit von Herz- und Skelettmuskulatur im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie bzw. diabetischen Myopathie liefern. Diese Arbeit könnte einen Beitrag leisten um Zielstrukturen zu identifizieren, die z.B. zur Behandlung der diastolischen Dysfunktion der diabetischen Kardiomyopathie dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material/Gewebeproben

Das verwendete linksventrikuläre Herz- und Skelettmuskelgewebe stammt von weiblichen Ratten (Stamm CR1:WI(Han)) der Charles River Laboratorien. Die Tiere wurden im Alter von sieben Wochen von den Laboratorien der Universität Münster übernommen. Die Ratten der Experimentalgruppe erhielten eine intraperitoneale STZ-Injektion in der Dosierung 100mg/kg Körpergewicht zwischen 5h und 24h nach Geburt. Die entsprechende Kontrollgruppe erhielt eine Injektion isotoner Kochsalzlösung selbigen Volumens. Beide Gruppen hatten einen uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter. Die Experimentalgruppe stellt ein anerkanntes Modell für nicht behandelten T1DM dar. Die Entwicklung des Diabetes mellitus wurde dabei durch Blutzuckermessungen nachvollzogen. Definiert wurde Diabetes mellitus ab einer Blutglucosekonzentration von über 250mg/dl. Eine Versuchsgruppe wurde nach 12 Wochen, die andere 20 Wochen nach Geburt mit Isofluran betäubt und durch cervicale Dislokation getötet. Die Herzen und Skelettmuskeln wurden entnommen, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Tiertötungen zur Organentnahme wurden 2009 entsprechend der damals geltenden Tierschutzrichtlinien und nach Genehmigung durch die örtlichen Behörden an der Universität Münster durchgeführt. Für die Experimente in der vorliegenden Dissertation wurden keine eigenen Tiertötungen oder Tierversuche durchgeführt, sondern lediglich konservierte Proben verwendet, die auch schon Krüger et al. (2010) nutzten.

2.1.2 Reagenzien

Die in den Versuchen verwendeten Reagenzien sind hier in Tabelle 1 aufgeführt.

Reagenz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Blotting Papier	Macherey Nagel

Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricon
Bradford	Thermo Fisher
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (<i>Western blotting detection reagent</i>)	Cyanagen
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
Imperial protein stain	Thermo Scientific
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appli Chem
Nonident P40	Sigma
PVDF-Membran	Roth
Salzsäure 32%	VWR
Serva Blue	Serva Electrophoresis GmbH
β -Mercaptoethanol	Sigma
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appli Chem
Thiourea	Appli Chem
Tricine	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Tween 20	Sigma
Urea	Appli Chem
<i>Whatman</i> -Papier	Whatman international Ltd.

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien und Hersteller

2.1.3 Lösungen und Puffer

Die in den Versuchen verwendeten Lösungen sind hier in Tabelle 2 aufgeführt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	250mM Tris 2M Glycin 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10x-Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) (pH 7,4)	0,2M Tris/HCl 1,5M NaCl 1% Tween-20
4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5M Tris/HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5M Tris/HCl 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Anodenpuffer (pH 8,8)	300mM Tris/HCl 100mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1x-TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300mM Aminocaprinsäure 30mM Tris/HCl
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	150mM Natriumchlorid 2,5mM Kaliumchlorid 1,5mM Kaliumdihydrogenphosphat 3mM Natriumdihydrogenphosphat
PVDF-destain	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
PVDF-stain	0,075% Serva Blue in Methanol
Titin-SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	8M Urea 2M Thiourea 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,035% (w/v) Serva Blue 10% (v/v) Glycerol 0,05M Tris / HCl
<i>Stripping buffer</i>	6M Guanidinhydrochlorid 20mM Tris 0,2% Nonident P40 0,1M β -Mercaptoethanol

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

2.1.4 Antikörper

Die für die molekularbiologischen Versuche verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt.

Die polyklonalen Antikörper gegen Titin und spezifische Phosphorylierungsstellen wurden von der Firma Eurogentec in Kaninchen erzeugt und affinitätschromatografisch aufgereinigt. Die Kaninchen wurden dazu mit folgenden Peptidsequenzen immunisiert: phospho S4010 (VRIEEGKpSLRFPC) und phospho S4099 (QANLFpSEWLRNID) der Titin-

N2-Bus-Region und phospho S11878 (CEVVLKpSVLRKR) und S12022 (KLRLPGpSGGEKP) der Titin-PEVK-Region. Nach Affinitätsreinigung der spezifischen Phospho-Antikörper wurden solche Antikörper gepoolt, die sowohl phosphoryliertes, als auch unphosphoryliertes Titin erkennen. Diese werden nachfolgend als „total-Titin“ Antikörper bezeichnet und als Beladungskontrolle verwendet. Dabei bezieht sich die Nomenklatur der Peptide auf die jeweiligen Sequenzen des humanen, kardialen Titins (UniProtKB: Q8WZ42).

Name des Antikörpers	Verdünnung	Hersteller	Hergestellt in
PEVK phospho S12022	1:2.000	Eurogentec	Kaninchen
PEVK phospho S11878	1:2.000	Eurogentec	Kaninchen
N2B(us) phospho S4010	1:5.000	Eurogentec	Kaninchen
N2B(us) phospho S4099	1:5.000	Eurogentec	Kaninchen
PEVK-total	1:50.000	Eurogentec	Kaninchen
PKC α (phospho T497)	1:10.000	Abcam	Kaninchen
PKC α (Y124)	1:10.000	Abcam	Kaninchen
TroponinI (phospho S23/24)	1:1.000	Cell Signaling	Kaninchen
TroponinI	1:2.000	Cell Signaling	Kaninchen

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Name des Antikörpers	Verdünnung	Hersteller	Hergestellt in
Anti-Kaninchen IgG, <i>horseradish-peroxidase-linked</i>	1:5.000	Cell Signaling	Ziege

Tabelle 4: Sekundärer Antikörper

2.1.5 Geräte

Die für die Versuche und deren Vorbereitung verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Laborgerät	Typ	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot	Turbo Biorad
Chemilumineszenz Imager	Imager Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad

Feinwaage	AE163	Mettler
Gefrierschrank	Typ 311104	Liebherr
Heizblock/Thermomixer	r Compact 5350	Eppendorf AG
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Professional Serie	VWR
Magnetrührer	RCT basic	IKA
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack P25	Biometra
PC Rechner	Akoya E622x series	Medion
pH-Meter	MP 220 Mettler	Toledo
Reagenzienschüttler (Vortexer)	444-1372	VWR
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific
Taumelrollmischer	RM5-30V	CAT
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore
Wasserbad	3042	Köttermann
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifugen

Tabelle 5: Geräte

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinbiochemie

2.2.1.1 Herstellung der Proteinlysate

Zunächst wurde von einer bei -80°C tiefgefrorenen Gewebeprobe ein ca. $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ mm großes Stück abgeschnitten. Dieses wurde dann mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert und auf einem Uhrglas mit etwa $80\text{-}150\mu\text{l}$ Titin-SDS-Probenpuffer versetzt (Tabelle 2). Nach dem kurzen Zentrifugieren der mit Proteinlysate gefüllten Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden diese für 3min bei ca. 98°C erhitzt, um die Proteinstruktur zu denaturieren. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels der photometrischen Bradford-Methode. Dazu wurden jeweils $2\mu\text{l}$ des 1:10 verdünnten Proteinlysats mit $800\mu\text{l}$ Wasser und $200\mu\text{l}$ Bradfordreagenz gemischt. Bei einer Lichtwellenlänge von 595nm wurde dann spektrophotometrisch die Absorption ge-

messen und anhand dieser annähernd die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt. Ca. 15-25µg Protein der jeweiligen Probe wurden auf die Polyacrylamidgele aufgetragen. Die aufgetragene Proteinmenge wurde dabei nach der ersten Gelelektrophorese mit der jeweiligen Probe nochmals optisch angepasst, da bei der Bradford-Methode teilweise Ungenauigkeiten auftraten.

2.2.1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine aus der jeweiligen Gewebeprobe wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet.

Die Proteine zur Repräsentation der Signalkaskade PKCα (61 bis 154kDa) und TroponinI (23,9kDa) wurden in einer 12,5% SDS-PAGE folgender Zusammensetzung separiert (Tabelle 6).

Lösung	Trenngel 12,5%	Sammelgel 4%
Acrylamid/Bis	6,25ml	0,667ml
H ₂ O	5ml	3,025ml
Trenngelpuffer	3,75ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25ml
TEMED	7,5µl	15µl
APS	75µl	50µl
Gesamtvolumen	15ml	5ml

Tabelle 6: Pipettierschema für je 2 SDS-Standardgele und Sammelgele

Zunächst wurden die Zutaten für das 12,5%ige Trenngel (Tabelle 6) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gefüllt und dann im zweiten Schritt mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) gründlich vermischt und zügig zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Um das Trenngel vom Luftkontakt zu trennen, wurde darüber eine Phase Isopropanol gegossen. Anschließend polymerisierte das 12,5%ige Trenngel (Tabelle 6) für mindestens 45min aus. Nach der Zeit des Aushärtens und anschließendem Abgießen des Isopropanols wurde über das Trenngel das Sammelgel (Tabelle 6) gegossen. Auch hier wurde bei der Herstellung des Gemisches erst im letzten Schritt APS hinzugefügt und dann zur Durchmischung auf- und abpipettiert.

Um das 3-3,7MDa große Protein Titin im Gel aufzutrennen, bedurfte es 2,3%igen agaroseverstärkten Polyacrylamidgelen, sog. Titingelen (Tabelle 7).

Lösung	Trenngel 2,3%
Acrylamid/Bis	1,53ml
H ₂ O	6,54ml
Trenngelpuffer	5ml
SDS 20%	100µl
TEMED	11,5µl
APS	150µl
Agarose 1,5%	6,67ml
Gesamtvolumen	20ml

Tabelle 7: Pipettierschema für 2 Titingele

Zur Herstellung der Titingele (Tabelle 7) wurde die Lösung zunächst in einem 50ml Falcon-Röhrchen im Wasserbad auf 45°C erhitzt und dann mit APS und mit in der Mikrowelle aufgekochter 1,5%iger Agarose versetzt. Weiter wurde die Lösung gründlich gemischt und dann zügig in Form gegossen, um ein Auskühlen und Aushärten zu verhindern. Die gegossenen Gele polymerisierten anschließend mindestens zwei Stunden aus.

Die eigentliche Proteinauftrennung erfolgte nun sowohl für Titin- als auch für 12,5%ige Gele gleichermaßen in den Gelelektrophoresesystemen Mini-PROTEAN von Biorad und Mini-Twin von Biometra. Dazu wurden die Kammern des Systems mit 1xLaufpuffer (Tabelle 2) befüllt und auf jedes Gel eine Stromstärke von 2-4mA angelegt, um die Proteinlösung ins Gel einlaufen zu lassen. Im Verlauf konnte die Stromstärke über den Trenngelen auf 15mA pro Gel erhöht werden. Über den Titingelen wurde sie bei 2-4mA pro Gel belassen.

2.2.1.3 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss in einem *semidry*-Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel auf die in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Darunter wurden fünf in Anodenpuffer (Tabelle 2) getränkte *Whatman*-Papiere gelegt und darüber noch einmal fünf in Kathodenpuffer (Tabelle 2) getränkte *Whatman*-Papiere platziert. So konnte der Strom in der Blottingkassette von der oberen Kathodenplatte zur unteren Anodenplatte fließen und die Proteine auf die PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde eine Stromstärke von 1,5A bei maximal 20V angelegt, worunter der Transferprozess 12min in Anspruch

nahm. Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde die PVDF-Membran nach dem Blotten 20 Sekunden in PVDF-*stain* (Tabelle 2) eingefärbt und mit PVDF-*destain* (Tabelle 2) wieder entfärbt. Die in PVDF-*destain* enthaltene Essigsäure wurde durch mehrfaches Schwenken in 1xTBST ausgewaschen.

2.2.1.4 Inkubation der Antikörper

Um Reaktionen der Antikörper mit unspezifischen freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran möglichst vorzubeugen, wurden diese mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein blockiert. Hierzu wurde 2%iges bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Das Einwirken von BSA wurde jeweils für min. eine Stunde auf dem Laborschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Inkubation der Blotmembranen mit den primären Antikörpern (Tabelle 3) erfolgte jeweils verdünnt in 2% BSA in 1xTBST in einem 50ml Falcon-Röhrchen auf einem Taumelrollmischer über Nacht bei 4°C. Der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper (Tabelle 4) wurde in selbigem Verfahren in einer Verdünnung von 1:5000 in 2% BSA in 1xTBST 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen den Inkubationen mit den jeweiligen Antikörpern wurden die Blotmembranen jeweils mindestens dreimal zehn Minuten in 1xTBST gewaschen, um nicht gebundene Antikörper abzuspülen.

Zur Detektion der Proteine wurde das Verfahren der Chemilumineszenz verwendet. Hierzu wurden die mit Antikörpern gekoppelten Proteine auf den Blotmembranen mit dem ECL (*Western blotting detection reagent*) 1 und 2 (Tabelle 2) im Verhältnis 1:1 bedeckt und folgend die Lichtreaktion durch den Fusion FX Imager (Vilbert & Lourmat) gemessen.

Das Phosphorylierungslevel der jeweiligen Proteinstellen wurde im Abgleich der Lichtreaktion eines phospho-Antikörpers (Tabelle 3) zu einem total-Titin Antikörper bestimmt. Dazu wurde der Blot zunächst mit einem phospho-Antikörper inkubiert. Dann wurde dieser phospho-Antikörper durch den mit β -Mercaptomethanol versetzten Stripping-Puffer (Tabelle 2) entfernt. Nach erneutem Waschen mit 1xTBST und Blockade mit BSA wurde der Blot im Sinne einer Ladungskontrolle mit dem PEVK-total Antikörper (total-Titin Antikörper) inkubiert.

Die jeweils gemessenen Lichtsignale wurden über Pixeldarstellung mittels ImageJ in Zahlenwerte umgesetzt. Aus dem Verhältnis der Lichtsignalstärke der phospho-Antikörper zu denen der total-Titin Antikörper, die die Menge des Gesamtproteins darstellen, lässt sich auf das Phosphorylierungslevel der jeweiligen Proteinstelle schließen. Verglichen wurden dabei immer diejenigen Blots, die zuerst mit dem phospho- und dann mit dem total-Titin Antikörper behandelt wurden. Eine Normierung durch die Division der Werte durch den Mittelwert der Kontrollproben schaffte Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Blots. Daher handelt es sich bei den angegebenen Zahlen um relative Werte.

2.2.2 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte über die Ermittlung des Mittelwerts und des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM). Dies erfolgte über die Anzahl der voneinander unabhängig durchgeführten Versuche (n), wobei pro Versuchsgruppe jeweils fünf Gewebe von unterschiedlichen Individuen der Ratten zur Verfügung standen. Pro untersuchter Phosphorylierungsstelle und Gewebe wurde mindestens dreimal das Phosphorylierungslevel per SDS-Page, Western Blot und Antikörperdetektion bestimmt und in der Auswertung berücksichtigt. Mit der Software GraphPad Prism 8 erfolgte ein ungepaarter zweiseitiger t-Test. Dabei wurde die Kontrollgruppe als Norm angenommen und die Experimentalgruppe (STZ-Gruppe) dazu in Bezug gesetzt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ angenommen.

2.2.3 Software

Die folgende Software wurde für die Erarbeitung und Auswertung der Arbeit benutzt: Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010, Microsoft Powerpoint 2010, ImageJ, Adobe Photoshop CS6, EndNote X8 und GraphPad Prism 8.

3 Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob Diabetes mellitus Typ 1 im STZ-Rattenmodell potentiell einen Einfluss auf die Titin-Phosphorylierung und damit evtl. auf die passive Steifigkeit von Herz- und Skelettmuskulatur hat, wurden zwei Muskelgruppen von diabetischen Tieren und Kontrolltieren auf ihre jeweiligen Titin-Phosphorylierungslevel analysiert. Dazu wurden zum einen linksventrikuläres Muskelgewebe und zum anderen Proben der Musculi quadriceps femoris und psoas analysiert. Im Speziellen wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen Proteinstellen betrachtet, die für die Titin-basierte Steifigkeit von Bedeutung sind. Dazu zählen im linken Ventrikel die Titin-PEVK-Region mit den Serinresten 11878 und 12022 und die N2-Bus mit den Serinresten 4010 und 4099. Weiterhin wurde der Phosphorylierungsstatus der Kinase PKC α und des myokardialen TroponinI analysiert, um auf etwaige Veränderungen in der Signalkaskade der Phosphorylierung zu schließen. Selbiges wurde für die Skelettmuskeln, Musculus quadriceps femoris und psoas, durchgeführt, die allerdings zur Regulation der Steifigkeit durch Phosphorylierung nur die genannten Serinreste in der Titin-PEVK-Region besitzen. Als phosphorylierende Kinase wurde hier im Signalweg exemplarisch die relative Phosphorylierung der PKC α untersucht.

3.1 Analyse der Titin-Phosphorylierungslevel des linken Ventrikels

3.1.1 PEVK-Serinrest 12022 ist bei 20 Wochen alten STZ-Tieren erhöht phosphoryliert

Die Analyse der Phosphorylierungslevel der Titin-PEVK-Region im linken Ventrikel zeigte die in Abb.7 dargestellten Ergebnisse. An S12022 zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Phosphorylierungslevel. Hier konnte festgestellt werden, dass diabetisches myokardiales Titin am Serinrest 12022 bei den 20 Wochen alten Tieren um $51,54 \pm 12,37\%$ erhöht phosphoryliert vorliegt, verglichen mit den gleichalten Kontrolltieren. Bei den 12 Wochen alten Tieren zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen diabetischen STZ- und nicht-diabetischen Kontrolltieren. Ebenso konnte an S11878 kein Unterschied der Phosphorylierungslevel zwischen Kontrolltieren und STZ-Tieren festgestellt werden. Insgesamt imponierte eine hohe Qualität der Signale und eine geringe Streuung der Werte.

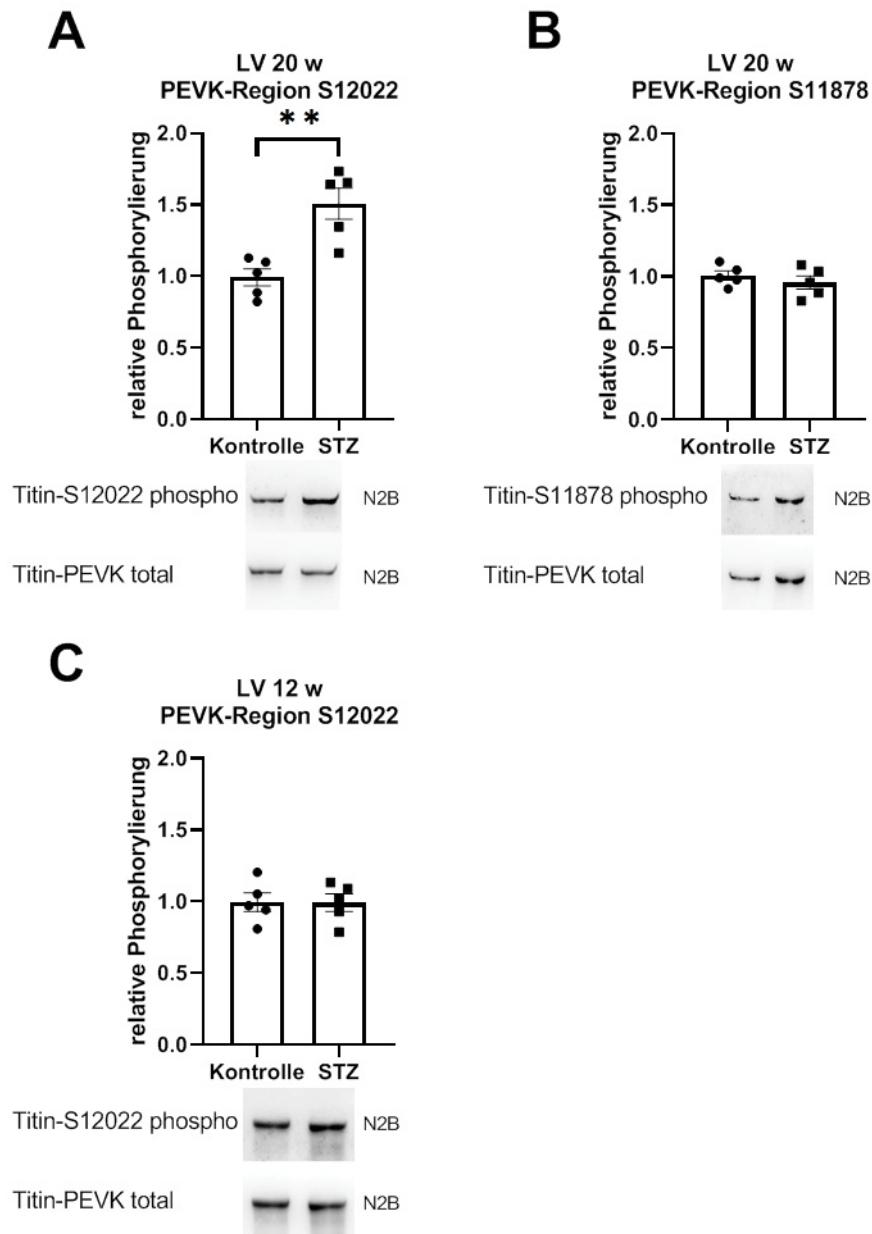


Abb.7: Darstellung der relativen Phosphorylierung von S11878 und S12022 im Myokard des linken Ventrikels von Ratten zum Zeitpunkt 20 und 12 Wochen (w). Die y-Achse zeigt die relative Phosphorylierung und die x-Achse zeigt die beiden Versuchsgruppen der Kontrolltiere (Kontrolle) und der mit Streptozotolin behandelten diabetischen Gruppe (STZ). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Phosphorylierung \pm den Standardfehler (SEM). Pro Versuchsgruppe wurden n=5 Gewebe untersucht. * zeigt dabei statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ im ungepaarten zweiseitigen t-Test). Die repräsentativen Blotbilder zeigen die durch entsprechende Antikörper markierten Phosphorylierungsstellen an der Titin-N2B Isoform. Gezeigt ist die relative Phosphorylierung von S12022 zum Zeitpunkt 20 w (**A**) und 12 w (**C**) sowie die relative Phosphorylierung von S11878 zum Zeitpunkt 20 w (**B**). S12022 ist zum Zeitpunkt 20 w (**A**) in der STZ-Gruppe signifikant erhöht phosphoryliert ($p=0,0031$).

3.1.2 Kein Unterschied der Phosphorylierungslevel in N2-Bus-Region

In der herzmuskelspezifischen Titin-N2-Bus-Region konnte kein Unterschied in den Phosphorylierungsleveln der Serinreste 4010 und 4099 zwischen den diabetischen und nicht-diabetischen Geweben der 20 Wochen alten Tiere festgestellt werden. Auch die Untersuchung der 12 Wochen alten Tiere zeigte keine signifikant veränderte Phosphorylierung des Serinrestes 4010 in den diabetischen Tieren. Dies ist in Abb.8 dargestellt. Die Arbeit mit dem Antikörper gegen S4099 phospho gestaltete sich in der Signalverarbeitung als schwierig, da hier häufiger unspezifische Störsignale auftraten.

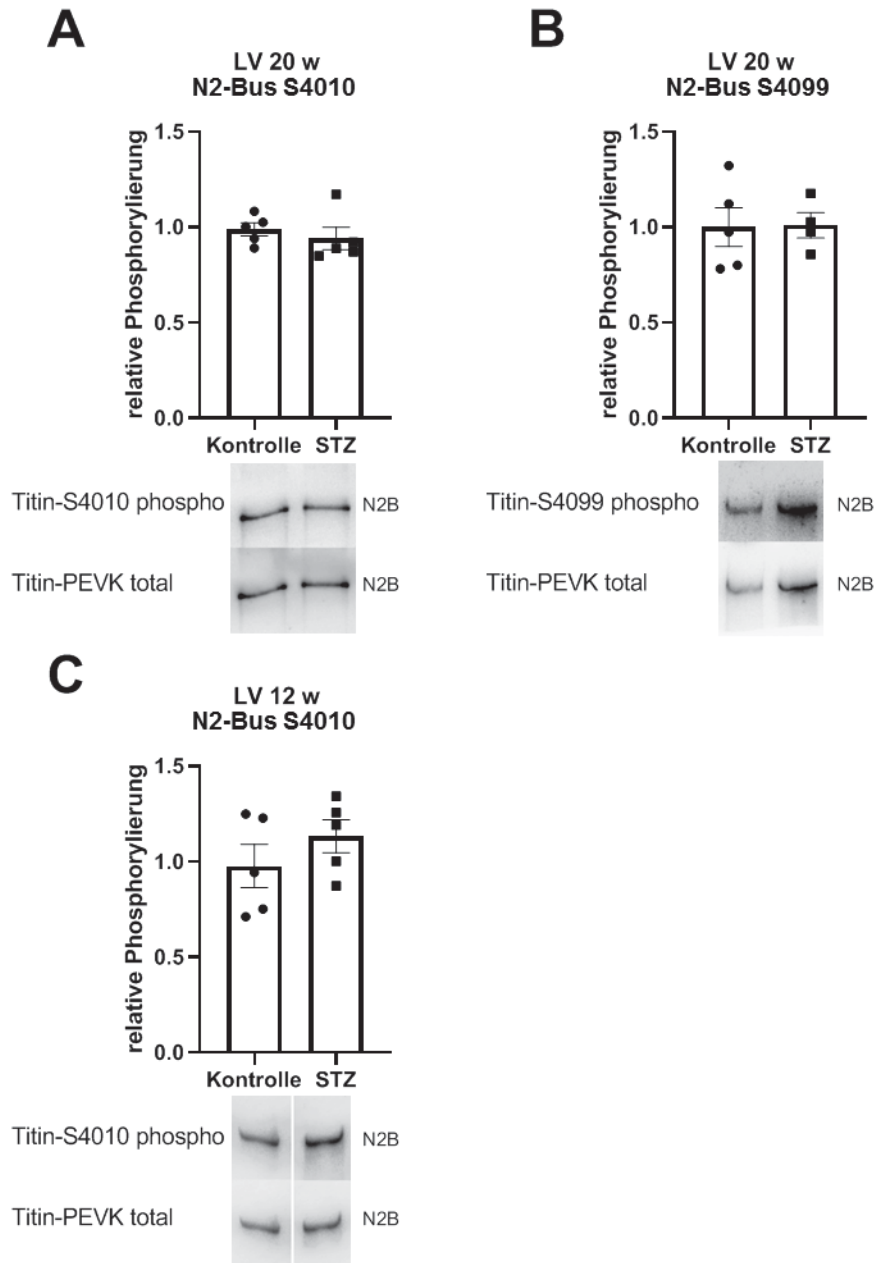


Abb.8: Darstellung der relativen Phosphorylierung von S4010 und S4099 im Myokard des linken Ventrikels von Ratten zum Zeitpunkt 20 und 12 Wochen (w). Die y-Achse zeigt die relative Phosphorylierung und die x-Achse zeigt die beiden Versuchsgruppen der Kontrolltiere (Kontrolle) und der mit Streptozotolin behandelten diabetischen Gruppe (STZ). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Phosphorylierung \pm den Standardfehler (SEM). Pro Versuchsgruppe wurden n=4-5 Gewebe untersucht. Es wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test durchgeführt. Die repräsentativen Blotbilder zeigen die durch entsprechende Antikörper markierten Phosphorylierungsstellen an der Titin-N2B Isoform. N2B bezeichnet die Titin-Isoform. Gezeigt ist die relative Phosphorylierung von S4010 zum Zeitpunkt 20 w (**A**) und 12 w (**C**) sowie die relative Phosphorylierung von S4099 zum Zeitpunkt 20 w (**B**).

3.1.3 Keine Unterschiede in der Phosphorylierung möglicher beteiligter Kinasen

In einem nächsten Schritt wurde die Aktivierung von Kinasen untersucht, die eine Änderung der Titinphosphorylierung hervorrufen könnten. Als Maß für die Aktivierung der Kinase-Signalwege wurde hierzu der Phosphorylierungsstatus von PKC α und TroponinI untersucht. PKC α phosphoryliert die Titin-PEVK-Region direkt, während das kardiale TroponinI über ähnliche Wege wie die herzspezifische Titin-N2-Bus phosphoryliert wird, also ein indirekter Marker ist. Weder in den 12 Wochen alten Tieren noch in den 20 Wochen alten Tieren wurden signifikante Änderungen im Aktivierungsstatus der beiden genannten Kinasen zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (Abb.9). Dabei war die Streuung der Werte der Proben der 12 Wochen alten Tiere deutlich größer als in den Proben der 20 Wochen alten Tiere. Der Standardfehler (SEM) für die relative Phosphorylierung von PKC α bei den 20 Wochen alten Tieren lag bei $\pm 12,7\%$, während er bei den 12 Woche alten Tieren bei $\pm 28,8\%$ lag.

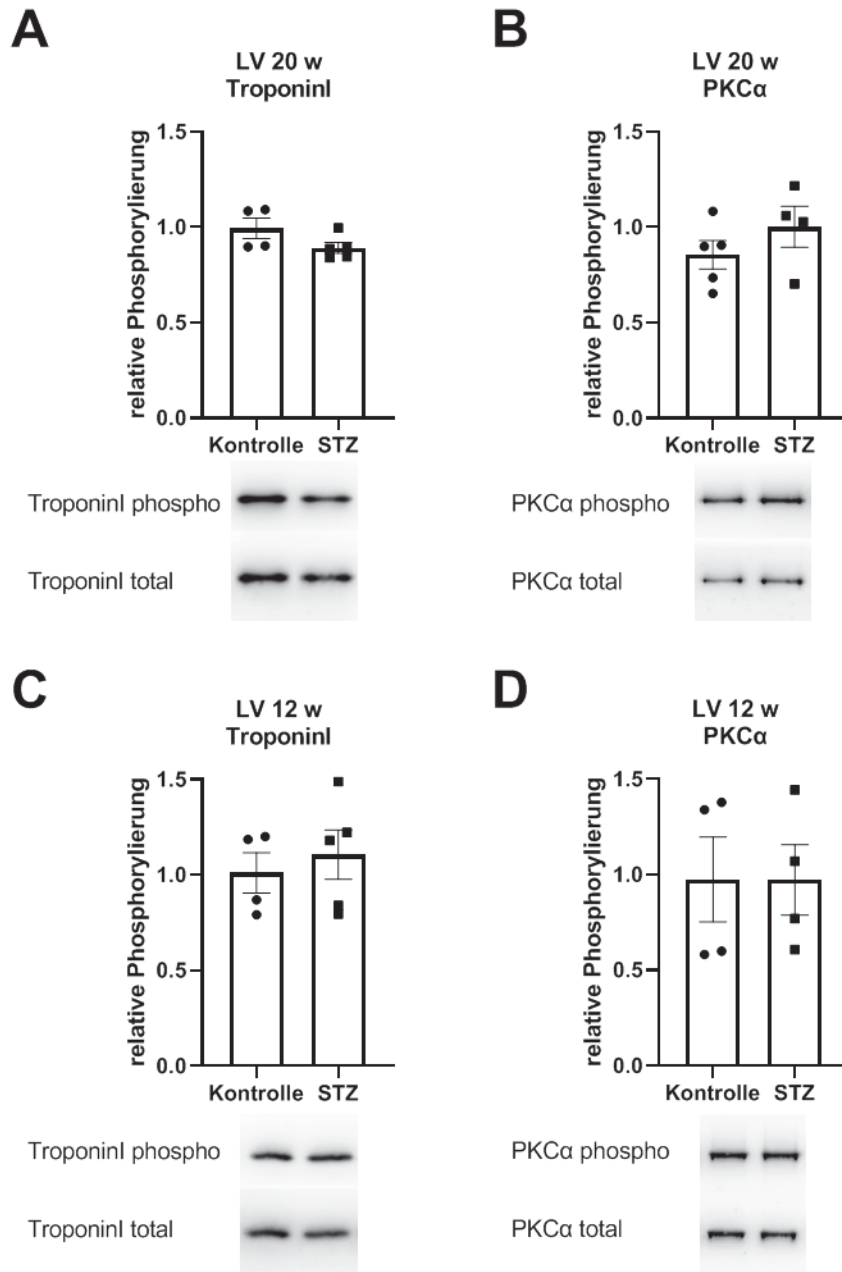


Abb.9: Darstellung der relativen Phosphorylierung von PKCα und TroponinI im Myokard des linken Ventrikels von Ratten zum Zeitpunkt 20 und 12 Wochen (w). Die y-Achse zeigt die relative Phosphorylierung und die x-Achse zeigt die beiden Versuchsgruppen der Kontrolltiere (Kontrolle) und der mit Streptozotocin behandelten diabetischen Gruppe (STZ). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Phosphorylierung ± den Standardfehler (SEM). Pro Versuchsgruppe wurden n=4-5 Gewebe untersucht. Es wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test durchgeführt. Die repräsentativen Blotbilder zeigen den durch entsprechende Antikörper markierten Phosphorylierungsstatus von TroponinI und PKCα. Gezeigt ist die relative Phosphorylierung von TroponinI zum Zeitpunkt 20 w (**A**) und 12 w (**C**) sowie die relative Phosphorylierung von PKCα zum Zeitpunkt 20 w (**B**) und 12 w (**D**).

3.2 Analyse der Titin-Phosphorylierungslevel der Musculi quadriceps femoris und psoas

3.2.1 S11878 vermindert und S12022 in Musculus psoas erhöht phosphoryliert

Die Skelettmuskelproben wurden nur zum Zeitpunkt 20 Wochen analysiert.

Der Serinrest 11878 war sowohl im Musculus quadriceps femoris als auch im Musculus psoas bei den 20 Wochen alten STZ-Tieren weniger phosphoryliert. Dabei war im Musculus quadriceps femoris die Phosphorylierung um $22,1 \pm 9,71\%$ gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Bei einem p-Wert=0,0524 zeigte sich hier allerdings kein signifikanter Effekt, aber ein deskriptiver Unterschied, der auf eine relevante Tendenz hinweist. Im Musculus psoas war die Phosphorylierung am S11878 der STZ-Tiere um $43,15 \pm 17,27\%$ gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert.

Anders verhielt es sich beim Serinrest 12022. Im Musculus psoas konnte eine um $27,33 \pm 10,72\%$ signifikant erhöhte Phosphorylierung in der STZ-Gruppe nachgewiesen werden. Im Musculus quadriceps femoris hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung von Serinrest 12022 festgestellt (Abb.10).

Bei der dargestellten T2-Bande handelt es sich um eine Degradationsbande des Titinproteins. Ihr wird in dem hier verwendeten Versuchsansatz keine analysierbare Bedeutung zuteil, da die hier verwendeten Antikörper unspezifisch an sie binden. Insgesamt war die Signalqualität der Skelettmuskelproben gegenüber der Signalqualität der Herzmuskelproben deutlich vermindert.

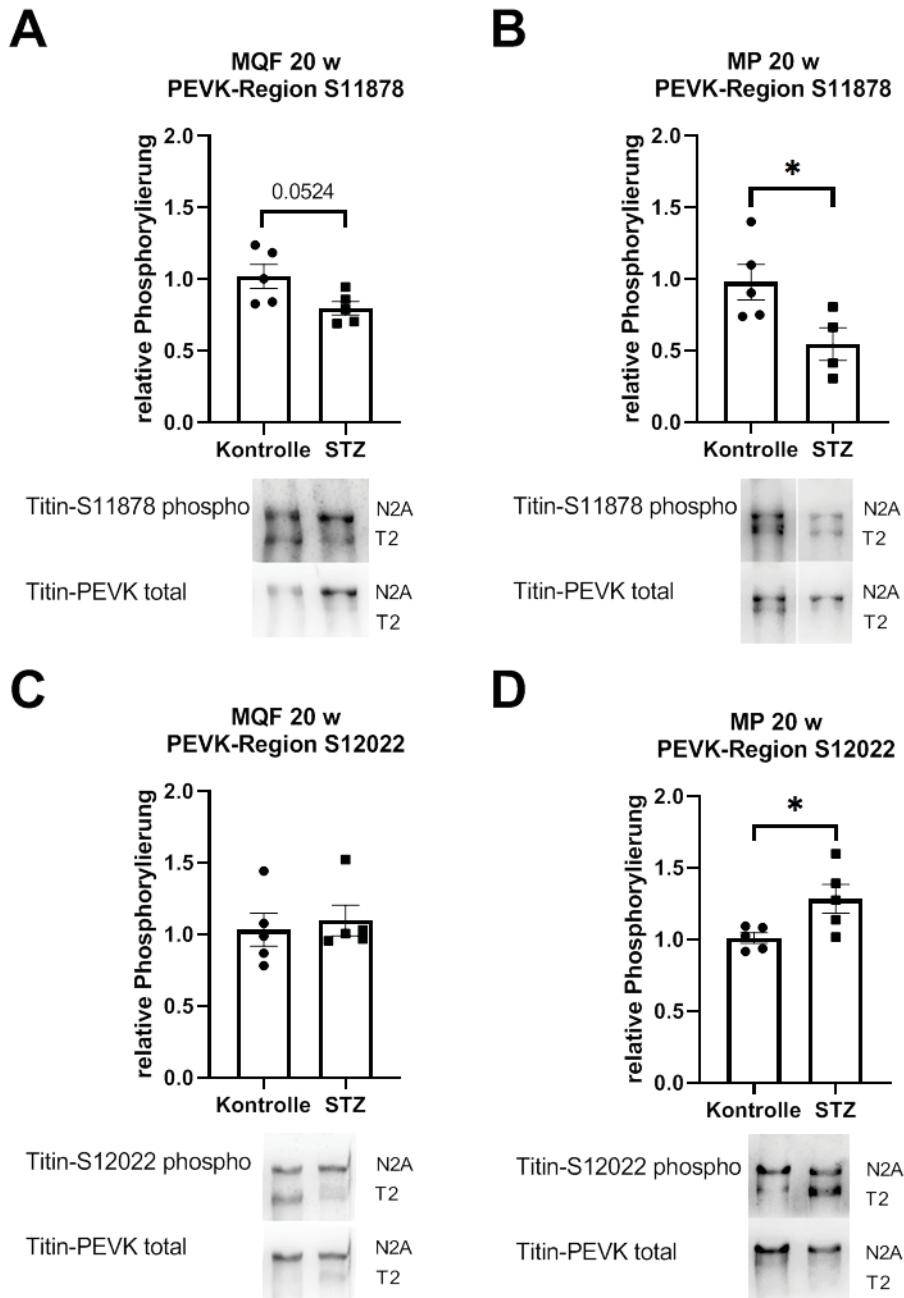


Abb.10: Darstellung der relativen Phosphorylierung von S11878 und S12022 in *M. quadriceps femoris* (MQF) und *M. psoas* (MP) von Ratten zum Zeitpunkt 20 Wochen (w). Die y-Achse zeigt die relative Phosphorylierung und die x-Achse zeigt die beiden Versuchsgruppen der Kontrolltiere (Kontrolle) und der mit Streptozotozin behandelten diabetischen Gruppe (STZ). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Phosphorylierung \pm Standardfehler (SEM). Pro Versuchsgruppe wurden n=5 Gewebe untersucht. * zeigt dabei statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ im ungepaarten zweiseitigen t-Test). Die repräsentativen Blotbilder zeigen die durch entsprechende Antikörper markierten Phosphorylierungsstellen an der Titin-N2A Isoform. N2A bezeichnet die Titin-Isoform und T2 die Degradationsbande. Gezeigt ist die relative Phosphorylierung im MQF von S11878 (A) und S12022 (C) und die relative Phosphorylierung im MP von S11878 (B) und S12022 (D). S11878 ist sowohl in MQF als auch im MP vermindert phosphoryliert. S12022 ist nur im MP in der STZ-Gruppe erhöht phosphoryliert.

3.2.2 Kein Unterschied in der PKC α -Phosphorylierung

In den Musculi quadriceps femoris und psoas ließ sich kein signifikanter Unterschied in den Phosphorylierungsleveln der Kinase PKC α von diabetischem und nicht-diabetischem Gewebe der 20 Wochen alten Tieren beobachten. Dies wird in Abb.11 grafisch gezeigt. Dabei war die Streuung der Werte des Musculus psoas hoch. Der Standardfehler lag hier bei $\pm 28,3\%$ im Musculus psoas gegenüber $\pm 12,8\%$ im Musculus quadriceps femoris. Auch hier zeigten sich die Signale im Gegensatz zur Herzmuskulatur in etwas geringerer Qualität.

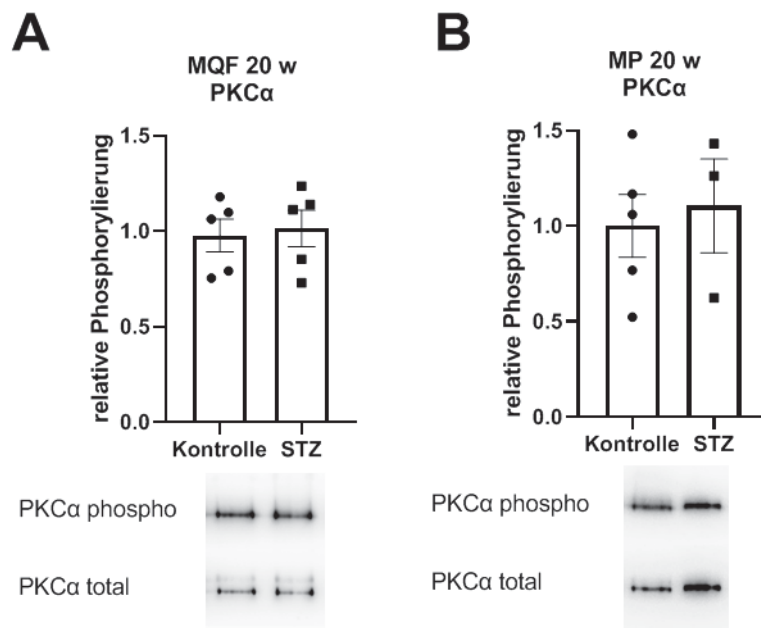


Abb.11: Darstellung der relativen Phosphorylierung von PKC α in M. quadriceps femoris (MQF) und M. psoas (MP) von Ratten zum Zeitpunkt 20 Wochen (w). Die y-Achse zeigt die relative Phosphorylierung und die x-Achse zeigt die beiden Versuchsgruppen der Kontrolltiere (Kontrolle) und der mit Streptozotocin behandelten diabetischen Gruppe (STZ). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Phosphorylierung \pm Standardfehler (SEM). Pro Versuchsgruppe wurden n=3-5 Gewebe untersucht. Es wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test durchgeführt. An den dargestellten Modellblots sind die Darstellungen jeweils mit den entsprechenden durch Antikörper markierten Phosphorylierungsstellen beschriftet. **A** zeigt die relative Phosphorylierung von PKC α im MQF. **B** zeigt die relative Phosphorylierung von PKC α im MP.

4 Diskussion

4.1 Diabetes mellitus Typ 1 erhöht die Titin-PEVK Phosphorylierung im Myokard – Hinweis auf diastolische Dysfunktion

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit bezogen auf die Herzmuskulatur ist, dass die Titin-Phosphorylierung durch T1DM entweder in der PEVK-Region erhöht und/oder in der N2-Bus vermindert ist. Dies könnte eine erhöhte passive Steifigkeit des Myokards bedingen und somit ein Baustein zur Erklärung der diastolischen Dysfunktion im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie sein.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich diese Hypothese stützen. Die Phosphorylierung an S12022 in der Titin-PEVK-Region des linken Ventrikels ist bei 20 Wochen alten STZ-Tieren signifikant erhöht (Abb.7), was auf eine Zunahme der passiven Steifigkeit schließen lässt. Diese Erkenntnis korreliert wiederum mit der in anderen Studien beobachteten diastolischen Dysfunktion, die durch erhöhte passive Steifigkeit des linken Ventrikels bei diabetischer Kardiomyopathie mitverursacht wird (Lind et al., 2011, Rosengren et al., 2015, Schannwell et al., 2002).

Die Titin-Phosphorylierung ist eine wichtige posttranslationale Modifikation zur Regulation der passiven Steifigkeit des Biopolymers Titin. Dabei geht man davon aus, dass es durch Phosphorylierung zu einer Persistenzlängenveränderung in der N2-Bus-Region bzw. der PEVK-Region kommt (Rief et al., 1997). In der kardialen N2-Bus-Region kommt es durch Einfügen eines negativ geladenen Phosphatrestes zu vermehrten elektrostatischen Abstoßungskräften und in dessen Folge es zu einer Vergrößerung der Persistenzlänge und damit Abnahme der passiven Steifigkeit kommt (Krüger et al., 2009). In der PEVK-Region passiert auf Grund des höheren isoelektrischen Punktes genau das Gegenteil. Durch Einfügen eines negativ geladenen Phosphatrestes nimmt hier die passive Steifigkeit zu (Hidalgo et al., 2009). Die Veränderung der passiven Muskelsteifigkeit durch Titinphosphorylierung ist dabei recht gut untersucht und durch Antikörper im Western-Blot hinreichend darstellbar.

Neben der posttranslationalen Veränderung der Steifigkeit durch Phosphorylierung könnte auch eine modifizierte Titinisoformenkomposition zu einer diastolischen Dysfunktion bei T1DM beitragen. In dem hier untersuchten myokardialen Rattengewebe lässt sich die Isoformenzusammensetzung von N2B und N2BA Titin nur schwer unter-

suchen. Der elastischere N2BA-Anteil liegt im Myokard bei adulten Ratten bei nur ca. 15% (Cazorla et al., 2000, Warren et al., 2004). Somit lassen sich experimentell durch SDS-PAGE nur sehr schwer signifikante Veränderungen des Isoformenverhältnisses feststellen. Auch weitere posttranslationale Veränderungen am Biopolymer Titin, wie z.B. Disulfidbrückenbildung, Glutathionylierung und Arginylierung, könnten bei diastolischen Funktionsstörungen eine Bedeutung haben (Nedrud et al., 2011, Alegre-Cebollada et al., 2014, Leite et al., 2016). Diese Mechanismen und ihr Einfluss auf die myokardiale Steifigkeit wurden in den hier vorliegenden Experimenten nicht berücksichtigt und sind Gegenstand aktueller Forschung.

STZ-induzierter T1DM hat viele pathophysiologische Veränderungen innerhalb der Herzfunktion zur Folge. Titin nimmt als molekulare Stellfeder, wie bereits in der Einleitung beschrieben, für die Regulation der passiven Rückstellkräfte innerhalb der Sarkomerfunktion eine zentrale Rolle ein.

Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass bei Patient*innen und Modelltieren mit T1DM häufig eine diastolische Dysfunktion vorliegt, die auf eine erhöhte passive Steifigkeit der Herzmuskulatur zurückzuführen ist (Schannwell et al., 2002, van Heerebeek et al., 2008, Severson, 2004). Für humane Kardiomyozyten von Diabetiker*innen mit diastolischer Dysfunktion wurden neben der bereits erwähnten erhöhten Ruhesteifigkeit der Kardiomyozyten auch Fibrosierung und ein verstärktes Auftreten von *Advanced Glycation Endproducts* nachgewiesen (van Heerebeek et al., 2008). Die hier im STZ-Tiermodell festgestellte erhöhte Phosphorylierung von S12022 in der Titin-PEVK-Region könnte möglicherweise ebenfalls eine molekulare Ursache für die von van Heerebeek et al. (2008) berichtete erhöhte Ruhesteifigkeit bei Diabetiker*innen und dadurch hervorgerufene diastolische Dysfunktion im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie darstellen. In Versuchen mit denselben Geweben, die auch für diese Arbeit verwendet wurden, konnten Krüger et al. (2010) allerdings bei den diabetischen Ratten bei Einzelzellkraftmessungen keinen signifikanten Unterschied in der passiven Steifigkeit zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren feststellen, obwohl sich auch hier deutliche Veränderungen, wie kardiale Hypertrophie und eine Zunahme der Kollagendichte, des Myokards gegenüber der Kontrollgruppe zeigten (Krüger et al., 2010).

Warum sich die erhöhte passive Steifigkeit bei der diastolischen Dysfunktion im Rahmen von Diabetes mellitus in humanen Proben nachweisen lässt, in dem hier verwendeten STZ-Rattenmodell allerdings nicht, ist nicht geklärt.

Diskutiert werden könnte hier der Unterschied zwischen T1DM (STZ-Ratten-Modell) und T2DM (humane Proben von van Heerebeek et al. (2008) und Hopf et al. (2018)), Differenzen in den Phänotypen der Titin-Isoformen der verschiedenen Spezies und Kompensations- und Anpassungsmechanismen. Hopf et al. (2018) konnten zeigen, dass in humanem Herzgewebe von Patient*innen mit T2DM S4099 vermindert und S11878 erhöht phosphoryliert war und die passive Steifigkeit der Kardiomyozyten erhöht war. Dies korreliert nur zum Teil mit den hier gezeigten Ergebnissen im STZ-Rattenmodell, denn eine verminderte Phosphorylierung von S4099 in der N2-Bus zeigte sich nicht. Ebenso war in der Titin-PEVK-Region in dieser Arbeit S11878 nicht erhöht phosphoryliert, sondern S12022. Außerdem konnte in unserem STZ-Modell kein Anstieg der passiven Steifigkeit gezeigt werden (Krüger et al., 2010). Eine Rolle könnte hier der vorhandene Insulinmangel im T1DM STZ-Modell spielen. Hopf et al. (2018) konnten zeigen, dass Insulin eine erhöhte PKC α Aktivität und damit eine erhöhte S11878 Phosphorylierung verursacht, was zu einer erhöhten passiven Steifigkeit führt. Da in dem hier verwendeten STZ-Modell ein absoluter Insulinmangel vorliegt, der im Falle von T2DM nicht besteht, könnte dies auch erklären warum PKC α in unserem Modell nicht erhöht phosphoryliert war. Die Unterscheidung von T1DM und T2DM scheint also durchaus Effekte auf die Titinphosphorylierung und passive Steifigkeit von Kardiomyozyten zu haben. Insulin als zentraler Modulator, könnte hier eine wichtige Rolle spielen. Dies wird nochmal näher im Kapitel zu den Signalwegen erläutert. Ebenfalls ist nicht außer Acht zu lassen, dass es in den Phänotypen von Titin-Isoformen zwischen Nagetieren und Menschen größere molekulare Unterschiede gibt und daraus resultierend auch verschiedene Signalwege und mechanofunktionale Eigenschaften (Neagoe et al., 2003).

Warum von Krüger et al. (2010) keine erhöhte passive Steifigkeit der Kardiomyozyten der STZ-Ratten nachgewiesen werden konnte, sollte auch nochmal vor dem Hintergrund der Ergebnisse bei den 12 Wochen alten Ratten analysiert werden. Schaut man sich den zeitlichen Ablauf der Erhöhung des Phosphorylierungslevels am Serinrest 12022 an, fällt auf, dass bei den 12 Wochen alten Tieren zunächst noch keine erhöhte

Phosphorylierung zu sehen ist (Abb.7). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass es sich bei Titin-Phosphorylierung um eine posttranslationale, also eher schnell ablaufende Modifikation handelt. In diesem Modell deutet einiges darauf hin, dass die erhöhte PEVK-Phosphorylierung im Rahmen eines chronischen Prozesses mit veränderten Kinase- und Phosphataseaktivitäten, anstatt einer Akutadaptation zu sehen ist. Dies stimmt auch damit überein, dass sich die meisten Folgeerscheinungen der Diabeteserkrankung erst im chronischen Verlauf der Erkrankung und besonders bei schlecht eingestellten Blutzuckerwerten niederschlagen (Park et al., 2006, Park et al., 2009, Deshpande et al., 2008). Der Organismus ist dann gezwungen, immer weitere Adaptationsmechanismen miteinzubeziehen, um die Organfunktion optimal aufrecht zu erhalten. Es ist also gut möglich, dass bisher unbekannte Kompensations- bzw. Adaptationsmechanismen in dem hier verwendeten Modell eine Zunahme der myokardialen Steifigkeit verhindern. Eventuell würde eine Untersuchung der Gewebe bei einem höheren Lebensalter als 20 Wochen auch eine Zunahme der myokardialen Steifigkeit zeigen, wenn etwaige Kompensationsmechanismen ausgereizt wären. Dies müsste weiter untersucht werden.

Vergleicht man hierzu Arbeiten, in denen die myokardiale passive Muskelsteifigkeit bei Herzinsuffizienz untersucht wurden, fällt auf, dass auf funktionaler Ebene die myokardiale passive Muskelsteifigkeit bei verschiedenen Formen von Herzinsuffizienz tendenziell eher zunimmt (Koser et al., 2019, Kötter et al., 2013, Hopf et al., 2018). Auch im Falle von Diabetes mellitus lässt sich recht eindeutig zeigen, dass die titinbasierte myokardiale Steifigkeit zunimmt (Hopf et al., 2018, van Heerebeek et al., 2008).

Analysiert man die Literatur auf das Phosphorylierungsverhalten von Titin in Hinblick auf myokardiale Pathologien zeigt sich in einigen Untersuchungen, dass die Gesamtphosphorylierung von Titin eher abnimmt bzw. unverändert bleibt (Koser et al., 2019, Hamdani et al., 2013, Krüger et al., 2010). Allerdings ist mittlerweile klar, dass die in den zuvor genannten Studien verwendete Färbemethode mit ProQ-Diamond nur ein Bild über die Phosphorylierung von Titin in der N2-Bus vermittelt und damit die PEVK-Region außer Acht lässt. Dies unterstreicht nochmals die Wichtigkeit sich einzelne Phosphorylierungsstellen, wie in dieser Arbeit geschehen, explizit anzuschauen.

Mit der Untersuchung von Hopf et al. (2018) wurde erstmals in größerem Umfang der Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus, Titinphosphorylierung und passiver myokardialer Steifigkeit untersucht. Es konnte in humanen Proben gezeigt werden, dass bei

T2DM die myokardiale Steifigkeit zunimmt, vermutlich verursacht durch erhöhte S11878 Phosphorylierung in der PEVK-Region und verminderte S4099 Phosphorylierung in der N2-Bus. Ein besonderes Augenmerk fällt dabei auf S11878, der sowohl bei verschiedenen kardialen Pathologien mit Zunahme der myokardialen Steifigkeit, wie auch in T2DM-Modellen erhöht phosphoryliert war (Koser et al., 2019, Hopf et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie die myokardiale Steifigkeit zunimmt und dies gut durch ein verändertes Phosphorylierungsverhalten von Titin zu beschreiben ist.

Aus all den genannten Aspekten ergibt sich die Frage, ob der Mechanismus der Phosphorylierung von S12022 in der Titin-PEVK-Region und damit vermutlichen Erhöhung der passiven Titinsteifigkeit adaptiv oder maladaptiv im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie zu verstehen ist. Dies sollte vor dem Hintergrund des Mechanismus der längenabhängigen Aktivierung bzw. des daraus resultierende Frank-Starling-Mechanismus analysiert werden. Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt den Zusammenhang von Ventrikelfüllung und Auswurfleistung (Fukuda et al., 2001). Die genauen molekularbiologischen Abläufe sind hier allerdings noch nicht verstanden. Der sarkomerlängenabhängigen Calcium-Sensitivität, auf die auch Titinmodifikationen wie z.B. Phosphorylierung oder Isoformenzusammensetzung einen Einfluss haben, wird eine wichtige Rolle zugeschrieben (Vikhorev et al., 2020, Fukuda et al., 2003). Wird der Ventrikel im Falle von diastolischer Dysfunktion durch erhöhte passive Steifigkeit des Myokards weniger mit Blut gefüllt, entwickelt sich zuerst ein *heartfailure with preserved ejection fraction* (HFpEF). Wenn im Verlauf der Erkrankung durch einen Abfall der längenabhängigen Aktivierung die Auswurfleistung abnimmt, spricht man von *heartfailure with reduced ejection fraction* (HFrEF). Ein Beispiel wäre hier die dilatative Kardiomyopathie, für die gezeigt werden konnte, dass hier die längenabhängige Aktivierung abnimmt (Vikhorev et al., 2020). Folglich ist es für die Herzfunktion von elementarer Bedeutung, dass die längenabhängige Aktivierung und damit auch der Frank-Starling-Mechanismus suffizient funktioniert und nicht durch Zunahme der passiven Steifigkeit behindert wird. Die von uns gezeigte erhöhte Phosphorylierung von S12022 in der Titin-PEVK-Region ist genau solch ein Mechanismus, der den beschriebenen Ver-

lauf von HFpEF zu HFrEF bedingen könnte. Die erhöhte S12022 Phosphorylierung wäre also folglich als eher maladaptiv in diesem Zusammenhang zu betrachten.

Gilt die Annahme, dass HEpEF ein Frühstadium von HErEF ist, ist es umso wichtiger, die pathophysiologischen Mechanismen zu verstehen, die zu einer Reduktion der Herzfunktion führen, um eventuell in Zukunft therapeutisch in diesen Prozess eingreifen zu können.

Um genauere Schlüsse darüber ziehen zu können, müssten weitere Titin-Phosphorylierungsstellen und verschiedene Tiermodelle analysiert werden. Durch die Vielzahl von potentiellen Konfundierungen, wie Modell-Lebewesen, analysierte Pathologien und Versuchsbedingungen, lassen sich weiterhin nur Teilbereiche der Pathophysiologie der diabetischen Kardiomyopathie beleuchten. Sicher ist, dass in diesem Feld noch weitere Forschung nötig sein wird, um etwaige Therapieansätze zu verfolgen, die die diastolische Dysfunktion abschwächen. Titin ist dabei als multifunktionale Stellfeder des Myokards eine wesentliche Zielstruktur.

4.2 Diabetes mellitus Typ 1 beeinflusst die Phosphorylierung von Titin in der Skelettmuskulatur

Auch in der Skelettmuskulatur ist Titin die maßgebliche Stellschraube für die passive Kraftentwicklung (Joumaa et al., 2008). Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die Titin-PEVK-Phosphorylierung durch den Einfluss von T1DM, wie im Myokard, auch in den untersuchten Musculi psoas und quadriceps femoris verändert ist. Diese veränderte Phosphorylierung könnte durch Modifikation z.B. der passiven Steifigkeit dazu beitragen die beschriebene diabetische Myopathie weitergehend zu verstehen. Für die Modifikation der Titin-Steifigkeit durch Phosphorylierung steht in der Skelettmuskulatur besonders die Titin-PEVK-Region im Fokus, da die in der Skelettmuskulatur enthaltene N2A-Isoform keine kardiale N2-Bus enthält. Da auch in den linksventrikulären Proben nur Veränderungen bei den 20 Wochen alten Tieren festzustellen waren, und es sich bei T1DM um eine chronisch verlaufende Erkrankung handelt, die sich meist durch ihre Folgeerscheinungen erst im Erwachsenenalter auswirkt, wurden nur Skelettmuskeln der erwachsenen 20 Wochen alten Tiere untersucht.

Die Ergebnisse unserer Arbeit stärken die Hypothese, dass die PEVK-Phosphorylierung in den untersuchten Skelettmuskeln der STZ-Ratten verändert ist.

Im Musculus psoas der STZ-Tiere ist gleichzeitig bei erniedrigter S11878-Phosphorylierung S12022 erhöht phosphoryliert (Abb.10). Bisherige Arbeiten hatten gezeigt, dass eine verstärkte Phosphorylierung der Serinreste in der PEVK Region zu einem Anstieg der passiven Titinsteifigkeit führt, und umgekehrt eine verminderte Phosphorylierung zu einem Abfall (Hidalgo et al., 2009). Dies würde bedeuten, dass in den hier untersuchten Proben zwei gegensätzliche Prozesse hinsichtlich der passiven Steifigkeit stattfinden und die erhöhte S12022 Phosphorylierung möglicherweise durch die erniedrigte S11878 Phosphorylierung ausgeglichen wird (Hidalgo et al., 2009). Anders verhält es sich am Musculus quadriceps femoris (Abb.10). Hier zeigte sich neben der tendenziellen Abnahme der S11878 Phosphorylierung keine erhöhte S12022 Phosphorylierung. Dies könnte bedeuten, dass die verminderte S11878 Phosphorylierung auch eine Abnahme der Titin-basierten Myofilamentsteifigkeit zur Folge hat. Es konnte also gezeigt werden, dass T1DM im STZ-Rattenmodell einen Einfluss auf die Titin-PEVK-Phosphorylierung hat.

Die folgenden Abschnitte beleuchten genauer, wie diese veränderte Phosphorylierung im Rahmen von T1DM und diabetischer Myopathie zu verstehen sein könnte, und wie die passive und aktive Kraftentwicklung in Abhängigkeit der Phosphorylierung der Titin-PEVK-Region beeinflusst werden könnte.

Zunächst muss Beachtung finden, dass die Titin-Phosphorylierung nur ein Mechanismus ist, um die passive Steifigkeit von Titin zu verändern. Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die N2A-Isoformenexpression, deren Einfluss auf die aktive und passive Kraftentwicklung in Skelettmuskulatur besser untersucht ist, und deren Erkenntnisse sich unter Vorbehalt auch auf die Auswirkungen von Titin-PEVK-Phosphorylierung auf die Skelettmuskelfunktion übertragen lassen.

Neagoe et al. (2003) konnten dabei erstmals zeigen, dass sich die passive Steifigkeit zwischen verschiedenen Skelettmuskeln in Abhängigkeit von der N2A-Isoformen-Expression in Skelettmuskeln unterscheidet. Die Größe der N2A-Isoform lag dabei in einem Bereich zwischen 3,3-3,7 MDa. Sarkomere mit längeren N2A-Isoformen zeigten dabei eine geringere passive Steifigkeit als Sarkomere mit kürzeren N2A-Isoformen. Dies konnten Brynnel et al. (2018) in einer aktuelleren Untersuchung durch Genmanipulation an N2A in einem Mausmodell bestätigen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Federelement Titin die passive Steifigkeit von Muskelzellen maßgeblich be-

stimmt und der vermutete Effekt von extrazellulärer Matrix hierauf als deutlich geringer einzuschätzen ist. Neagoe et al. (2003) konnten noch einen weiteren interessanten Aspekt darstellen. Die Größe der N2A-Isoform unterschied sich nicht nur von Muskel zu Muskel, sondern auch innerhalb eines Muskels zeigten sich verschieden große N2A-Isoformen. Für diese Arbeit scheint der Effekt der Isoformenzusammensetzung auf die passive Steifigkeit von Titin eher einen untergeordneten Effekt zu spielen. Innerhalb der Muskelproben zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Höhe der Titin-Bande von STZ-Muskelproben oder Kontrolltieren oder eine Aufteilung der Banden in längere und kürzere N2A-Isoformen, wie bei Neagoe et al. (2003). Somit ist zu vermuten, dass in dem hier verwendeten STZ-Rattenmodell die Titinphosphorylierung zur Modulation der passiven Steifigkeit eine maßgebliche Rolle spielt.

Resultierend aus der Frage welchen Einfluss Titin-Phosphorylierung auf die passive Steifigkeit hat, gilt es nun auch nochmal zu beleuchten, wie sich die Titin-Konfiguration auf die aktive Kraftentwicklung auswirkt, da wie folgend beschrieben die diabetische Myopathie vor allen Dingen mit einem Kraftverlust der Muskulatur einhergeht. Mateja et al. (2013) konnten hier mit ihrer Arbeit an einem durch eine Genmanipulation verlängertem Titin in einem Rattenmodell zeigen, dass längere Titin-Isoformen tendenziell nicht nur zu einer geringeren passiven Steifigkeit in Skelettmuskulatur führen, sondern auch die aktive Kraftentwicklung und die längenabhängige Aktivierung abnimmt. Hier rückt dann auch immer mehr in den Fokus, dass Titin nicht nur eine wichtige passive Funktion in der Stabilisierung der Sarkomerstruktur hat, sondern außerdem u.a. durch seine Bindung mit Aktin innerhalb der Titin-PEVK-Region als Element aktiver Kraftentwicklung gesehen wird (Gonzalez-Morales et al., 2017, Nagy et al., 2004, Freundt and Linke, 2019). Ob die veränderte PEVK-Phosphorylierung einen Einfluss auf diese Bindung mit Aktin und auch auf die Kraftentwicklung hat, wird Gegenstand weiterer Forschung sein. Sicher ist, dass Titin Teil einer oder mehrerer mechano-chemischer Signalkaskaden (Kötter et al., 2014, Krüger and Kötter, 2016), und Teil einer aktiven Kraftentwicklung in der Sarkomerstruktur ist (Rivas-Pardo et al., 2016, Li et al., 2016). Eine genauere Untersuchung der N2A-Isoformenexpression und Kraftmessungen sind nötig, um zu überprüfen, ob die Titinisoformen-bedingte Veränderung der passiven Steifigkeit und aktiven Kraftentwicklung, analog auch auf Titin-PEVK-Phosphorylierung zu übertragen ist. Dies würde bedeuten, dass durch Titin-PEVK-Phosphorylierung die pas-

sive und auch aktive Kraftentwicklung zunehmen könnte. Für das hier untersuchte STZ-Modell könnte dies bedeuten, dass im Musculus psoas die passive Steifigkeit und aktive Kraftentwicklung unverändert ist und im Musculus quadriceps femoris tendenziell eher abnimmt.

Im folgenden Abschnitt wird beleuchtet, wie aktive Kraftentwicklung und diabetische Myopathie miteinander zusammenhängen könnten. In Untersuchungen zur diabetischen Myopathie zeigte sich funktionell vor allem ein Muskelkraftverlust (Andersen et al., 2005, Andersen, 1998, Lesniewski et al., 2003, Sanchez et al., 2005). Für die Erklärung des Kraftverlustes gibt es verschiedene Theorien. Festzuhalten ist, dass insbesondere T1DM durch den ausgeprägten Insulinmangel einen großen Einfluss auf den Muskelmetabolismus hat. Bei Insulinmangel entsteht ein Substratmangel, da Glucose in der Skelettmuskulatur hauptsächlich durch den insulinabhängigen GLUT4 aufgenommen wird. Die mitochondriale ATP-Produktion ist somit deutlich herabgesetzt (Karakelides et al., 2007, Mogensen et al., 2007, Stump et al., 2003). Da ATP integraler Bestandteil des Querbrückenzyklus ist, ließe sich so durch ATP-Mangel teilweise der beschriebene Kraftverlust erklären.

T1DM stellt auch auf weiteren Ebenen die Zellstruktur vor Herausforderungen. Zum einen ist die Skelettmuskulatur in Metabolismus und Transkription maßgeblich von Insulin abhängig, zum anderen entsteht durch T1DM oxidativer Stress, der sich bei STZ-Ratten negativ auf die genetischen Reparaturmechanismen auswirkt (Aragno et al., 2004).

Daraus folgend stellt sich auch die Frage, welche Rolle Muskelatrophie im Rahmen der diabetischen Myopathie hat.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es im Rahmen von Diabetes mellitus zu einer Aktivierung des NF-kappaB Signalweges, der eng mit Muskelatrophie verknüpft ist, kommt (Kelleher et al., 2010). Inwieweit sich Kraftverlust und Atrophie im Rahmen der diabetischen Myopathie bedingen bleibt unklar. Für Titin könnte hier der *turnover* experimentell bestimmt werden. Beispielfhaft konnten Kötter et al. (2016) zeigen, dass im Falle eines Myokardinfarktes und erhöhter myokardialer Steifigkeit ein erhöhter Titin-*turnover* vorlag. In unserer Arbeit fehlen allerdings Kraftmessungen um zu überprüfen, ob die Skelettmuskulatur steifer wird, sowie eine Darstellung des Titin-*turnovers*.

Für Myopathien insgesamt konnte gezeigt werden, dass es zu einer Hypophosphorylierung in der Titin-PEVK-Region kommt, die in Verbindung mit einer Muskelatrophie und erhöhten passiven Steifigkeit durch Bindung von *heat shock* Proteinen gebracht wird (Unger et al., 2017). Diese Tendenz der Hypophosphorylierung in der Titin-PEVK-Region konnten wir an S11878 in diesem STZ-Rattenmodell ebenfalls beobachten.

Ebenfalls könnte von funktioneller Seite untersucht werden, ob verminderte Muskelkraft zu einer verminderten Benutzung der Muskulatur und es somit einer sich weiter verstärkten Muskelatrophie kommt. Miteinbeziehen in die Untersuchung der Muskelatrophie ließen sich auch die in dieser Arbeit auf den Western Blots gezeigten sog. T2-Banden (Abb.10). Die T2-Degradationsbande besteht aus einem großen Titinfragment, das A-Band-Titin und distale Ig-Segmente enthält (Helmes et al., 1996). Es ist jedoch nicht geklärt, welche Aussage deutliche oder weniger deutliche T2-Banden haben (Krüger and Kötter, 2016). Wobei zum Beispiel gezeigt werden konnte, dass im Musculus vastus lateralis von Athlet*innen gegenüber der Normbevölkerung weniger T2 anfällt (McBride et al., 2003). In dieser Arbeit lässt sich über die T2-Bande keine genauere Aussage erzielen, da sie nicht speziell erfasst und untersucht wurde. Allerdings wäre es in einem weiteren Schritt durchaus interessant zu schauen, ob bei T1DM Titin verstärkt abgebaut wird.

Es ist noch viel weitere Forschung nötig um den Zusammenhang zwischen T1DM, Muskelatrophie und Titinfunktionalität zu verstehen. Zu vermuten ist, dass im Rahmen der diabetischen Myopathie Atrophieprozesse ablaufen, die auch eine veränderte Titinphosphorylierung und eine veränderte passive Steifigkeit bedingen.

Welche Rolle und Auswirkung die in der hier durchgeführten Arbeit veränderte Titinphosphorylierung auf die passive Muskelsteifigkeit und die die aktive Kraftentwicklung hat, bleibt unklar.

Erwähnenswert ist, dass auf der Ebene des Phosphorylierungsstatus eine kurze Ausdauerbelastung einen ähnlichen Effekt auf die Titin-PEVK-Phosphorylierung hat, wie T1DM auf die Musculi psoas und quadriceps femoris in dem hier verwendeten Rattenmodell. Müller et al. (2014) konnten zeigen, dass durch Training im Musculus vastus lateralis S11878 vermindert und S12022 erhöht phosphoryliert ist. Hidalgo et al. (2009) Hidalgo et al. (2009) konnten in einem Mausmodell zeigen, dass durch Training bedingte Mehrbelastung S12022 im Diaphragma ebenfalls erhöht phosphoryliert ist.

Analysiert man die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse auf die Frage hin, ob die Hypophosphorylierung von S11878 in beiden untersuchten Muskeln und Hyperphosphorylierung von S12022 im Musculus psoas maladaptiv oder adaptiv sind, kann man auf Basis der genannten Kenntnisse nur Vermutungen anstellen. Herauszustellen gilt allerdings, dass Training und T1DM einen ähnlichen Effekt auf die Titinphosphorylierung in der Skelettmuskulatur haben (Müller et al., 2014, Hidalgo et al., 2014). Für die Hyperphosphorylierung von S12022 in STZ-Ratten gibt es Hinweise, dass hier eine erhöhte Steifigkeit die Integrität des A-Band Titins verbessert (Horowitz and Podolsky, 1988, Hidalgo et al., 2014). Das ließe den Schluss zu, dass die veränderte Phosphorylierung in der Skelettmuskulatur bei den STZ-Ratten eher ein adaptiver Prozess ist und durch die Phosphorylierung die Funktionalität und Integrität der Muskulatur hinsichtlich der längenabhängigen Aktivierung aufrechterhalten wird. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass die längenabhängige Aktivierung mit dem Grade der passiven Steifigkeit korreliert (Ait mou et al., 2008, Cazorla et al., 2001, Fukuda et al., 2003, Piroddi et al., 2007). Bei einer Abnahme der passiven Steifigkeit wurde auch eine Abnahme der längenabhängigen Aktivierung beobachtet (Cazorla et al., 2001, Helmes et al., 1996). Die genauen molekularen Mechanismen hinter der längenabhängigen Aktivierung sind bisher noch unklar (de Tombe et al., 2010). Methodisch kann man sich allerdings über die Korrelation zwischen der Calcium-Sensitivität und Sarkomerlänge und der sich daraus ergebenden Kraftentwicklung an die längenabhängige Aktivierung von Muskelfasern annähern. Bis zu einem gewissen Grad erzeugen höhere Sarkomerlängen eine höhere Calcium-Sensitivität und eine höhere Kraftentwicklung (Mateja et al., 2013). Titin spielt hier eine maßgebliche Rolle (Fukuda et al., 2001, Konhilas et al., 2002). Weiterhin kann auch beleuchtet werden inwieweit die hier gezeigte veränderte Titin-PEVK-Phosphorylierung im Zusammenhang mit Aggregation von *heat shock* Proteinen an Titin zu sehen ist (Unger et al., 2017). Eine verminderte S11878 Phosphorylierung und damit eine tendenzielle Abnahme der passiven Steifigkeit könnte hier ein Adaptationsmechanismus sein um eine erhöhte passive Steifigkeit durch *heat shock* Proteine auszugleichen. Dies könnte ebenfalls als adaptiver Mechanismus im Rahmen einer etwaigen Muskelatrophie bei diabetischer Myopathie gesehen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Einfluss von Titinphosphorylierung innerhalb der PEVK-Region im Rahmen der T1DM bedingten diabetischen Myopathie

nur schwer einordnen lässt. Weiter Untersuchungen über den Einfluss der veränderten Phosphorylierung auf die passive Steifigkeit, Muskelatrophie und muskel- und spezie-abhängige Differenzen müssten hier folgen. Zusätzlich ist klar, dass Titinphosphorylierung in der PEVK-Region nicht der einzige Mechanismus zur Regulation der passiven Steifigkeit im Rahmen der diabetischen Myopathie ist. Denn durch oxidativen Stress bei T1DM haben reaktive Sauerstoffspezies ein hohes Potential, Aminosäurereste zur z.B. Disulfidbrückenbindung miteinander zu verknüpfen und einen Effekt auf die passive Steifigkeit auszuüben (Grützner et al., 2009, Alegre-Cebollada et al., 2014). Ein zentraler Regulationspunkt hinsichtlich der Frage, ob die hier gezeigten Ergebnisse maladaptiv oder adaptiv zu werten sind, könnte die längenabhängige Aktivierung zu sein, die maßgeblich von Titin und der durch Titin erzeugten passiven Steifigkeit abhängt. Hier müssten weitere Experimente über den Einfluss von Titinphosphorylierung auf die Integrität des Sarkomers und längenabhängige Aktivierung durchgeführt werden.

4.3 Regulation der Titin-Phosphorylierung über Signalwege bei Diabetes mellitus

Typ 1

Aus der veränderten Titin-Phosphorylierung im STZ-Modell ergibt sich die Hypothese, dass auch in den Signalwegen, die zu einer veränderten Phosphorylierung der entsprechenden Serinreste führen, Veränderungen vorliegen sollten. Exemplarisch wurden die PKC α und TroponinI als Indikatoren ausgewählt.

PKC α phosphoryliert in der PEVK-Region S11878 und S12022 (Hidalgo et al., 2009). In der linksventrikulären Muskulatur und im Musculus psoas könnte PKC α bei erhöhter Phosphorylierung von S12022 in STZ-Tieren vermehrt aktiviert sein und in den untersuchten Skelettmuskeln bei verminderter S11878-Phosphorylierung vermindert aktiviert sein.

TroponinI repräsentiert in dieser Studie die Kinaseaktivität für die Phosphorylierung der N2-Bus-Region. Da in dieser kardialen Region keine veränderte Phosphorylierung vorliegt ist auch hier keine veränderte Phosphorylierung von TroponinI zu erwarten.

Weder in der Skelettmuskulatur noch in der Herzmuskulatur konnte eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus und damit Aktivität für PKC α und TroponinI gezeigt werden.

Dahingehend konnte die Hypothese in Hinblick auf TroponinI und N2-Bus bestätigt und in Hinblick auf PKC α und die PEVK-Region nicht bestätigt werden.

PKC α ist eine Kinase, die hauptsächlich in der Titin-PEVK Region S11878 und S12022 phosphoryliert (Hidalgo et al., 2009) und calciumabhängig über einen G-Protein gekoppelten Signalweg aktiviert wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte PKC α -Phosphorylierung mit einer erhöhten passiven Steifigkeit in Kardiomyozyten korreliert (Hidalgo et al., 2009). Dies wäre ein Erklärungsansatz für die diastolische Dysfunktion innerhalb der diabetischen Kardiomyopathie. Eine weitere Kinase, die die Titin PEVK-Region phosphoryliert, ist die CamKII δ , wobei noch nicht abschließend geklärt ist, ob S11878 auch Ziel dieser Kinase ist (Hidalgo et al., 2013, Hamdani et al., 2013).

Betrachtet man nun die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die PKC α Phosphorylierung weder in der Skelettmuskulatur noch in Kardiomyozyten bei STZ-Tieren erhöht oder erniedrigt phosphoryliert ist, jedoch Effekte an S11878 und S12022 nachzuweisen sind, muss davon ausgegangen werden, dass hier Phosphorylierung über eine andere Kinase als PKC α stattfindet. In Betracht kommt hier vor allem die CamKII δ . Für die Rolle von CamKII δ spricht, dass gezeigt werden konnte, dass diese Kinase im Falle von Herzinsuffizienz und Hypertrophie, wie man sie auch innerhalb der diabetischen Kardiomyopathie sieht, hochreguliert wird (Backs et al., 2009, Ling et al., 2009, Krüger et al., 2010). Die reproduzierbare Analyse der CamKII Aktivität ist schwierig und nicht analog zur PKC α mit Hilfe von phospho-spezifischen Antikörpern durchführbar. Aus diesem Grund wurde die Aktivität im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Betrachtet man nun noch einmal explizit die Skelettmuskulatur, fällt auf, dass die Erkenntnisse über die Rollen von Kinasen in der Titin-Phosphorylierung weitestgehend in Kardiomyozyten gewonnen wurden. Es ist möglich, dass in der Skelettmuskulatur weitere Signalkaskaden die Titin-Phosphorylierung steuern, die bislang nicht charakterisiert wurden. Insbesondere die erhöhte Phosphorylierung von S12022 bei gleichzeitiger erniedrigter Phosphorylierung von S11878 im Musculus psoas in den STZ-Tieren, deutet daraufhin, dass hier, in der Skelettmuskulatur, noch andere Kinasen eine Rolle spielen könnten. Diese Veränderungen sind nicht über die gängigen Signalwege von PKC α und CamKII δ zu erklären.

Für die Kinasen, die die N2-Bus phosphorylieren, gibt es keine hinreichend funktionellen Antikörper. Da TroponinI über ähnliche Signalwege phosphoryliert wird, wie die

Serinreste der N2-Bus, wurde es als Repräsentant für den Phosphorylierungsstatus der Signalwege ausgewählt. Die Serinreste 4010 und 4099 der N2-Bus werden durch PKA, PKG und ERK2 phosphoryliert (Krüger et al., 2009, Kötter et al., 2013, Raskin et al., 2012). TroponinI wird durch PKA, PKG und PKC phosphoryliert (Takimoto et al., 2004, Blumenthal et al., 1978, Noland et al., 1989). Hier gilt die Annahme, dass bei einer erhöhten Aktivität einer der genannten Kinasen auch TroponinI erhöht phosphoryliert sein müsste. Da weder für die Serinreste 4010 und 4099 noch für TroponinI eine veränderte Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte, ist dies in der Zusammenchau schlüssig. An den untersuchten Phosphorylierungsstellen S4010 und S4099 der N2-Bus liegt also mutmaßlich kein nennenswerter Regulationsort für die passive Steifigkeit von Titin im Falle von T1DM in diesem STZ-Modell. Einzig diese beiden Serinreste wurden untersucht, da sie am besten charakterisiert und evolutionär konserviert sind.

Schlussendlich gilt es nochmals, die hier unveränderte Phosphorylierung von PKC α und TroponinI in Hinblick auf die Erkrankung Diabetes mellitus zu analysieren. Wie bereits beschrieben ist Insulin über verschiedene Signalwege ein Modulator der Titinphosphorylierung (siehe Abb.5) und der Myozytenentwicklung. In dem in dieser Studie verwendeten STZ-Modell für T1DM ist ein deutlicher Insulinmangel durch den Untergang der β -Zellen im Pankreas zu vermuten. Hopf et al. (2018) konnten zeigen, dass Insulin zu einer erhöhten PKC α Aktivität führt. Dies entspräche komplementär unseren Beobachtungen, dass Insulinmangel nicht einen Anstieg, sondern eine unveränderte PKC α -Aktivität bedingt. In Folgestudien könnte hier nochmal der Insulin-Signalweg und sein Einfluss auf die Phosphorylierung und passive Steifigkeit in diesem STZ-Modell nachgegangen werden. Außerdem könnten Unterschiede zwischen T1DM und T2DM, sowie Herz- und Skelettmuskulatur untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulation der Titin-Phosphorylierung noch nicht abschließend geklärt ist. Die veränderte Phosphorylierung in der PEVK Region in diesem T1DM-Modell ist durch die untersuchten Teile des Signalweges nicht erklärbar und bedarf weiterer Forschung. Im Fokus steht dabei die Rolle der CamKII δ , die eine Vielzahl von Titinphosphorylierungsstellen phosphoryliert. Ferner gibt es die Möglichkeit, dass noch weitere Kinasen in die Titinphosphorylierung eingebunden sind, die bisher noch nicht bekannt sind. Ebenso könnten hier weitere Titin-Modifikationen, wie

Disulfidbrückenbildung, Glutathionylierung oder Arginylierung und entsprechende Signalwege untersucht werden. Gerade für die Skelettmuskulatur gibt es bisher kaum Untersuchungen in Hinblick auf die Signalwege. Außerdem könnte Insulin als wichtiger Baustein der Titinregulation noch weiter untersucht werden.

4.4 Limitationen

Diese Arbeit beleuchtet nur den Teilaspekt der Titinphosphorylierung im Rahmen der diabetischen (Kardio-)Myopathie und ist somit in ihrer Aussagekraft limitiert.

Ein Augenmerk der Limitierungen liegt auf methodischen Kriterien. Der Stichprobenumfang ist mit $n = \max. 5$ (min. 3) beschränkt. Um weitergehende statistische Aussagen treffen zu können, wäre es wünschenswert, den Stichprobenumfang zu erhöhen.

Die Auswahl der untersuchten Titin-Serinreste richtet sich an der Tatsache aus, dass S4010, S4099, S118787 und S12022 evolutionär konserviert sind (Hidalgo et al., 2009). Das bedeutet, dass Beobachtungen an diesen Serinresten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auch auf andere Säugetiere übertragen werden können. Außerdem konnte für alle hier untersuchten Serinreste nachgewiesen werden, dass sie durch Phosphorylierung einen Einfluss auf die passive Steifigkeit von Titin haben (Krüger et al., 2009, Hidalgo et al., 2009). Allerdings ist auch klar, dass es viele weitere Phosphorylierungsstellen an Titin gibt, die hier nicht untersucht wurden und trotzdem bei der Regulation der passiven Steifigkeit eine Rolle spielen (Hidalgo et al., 2009).

Die Auswahl der Skelettmuskelproben folgte willkürlich der Praktikabilität. Musculus psoas und quadriceps femoris sind relativ große Muskeln und damit recht einfach zu präparieren. Nachteilig an der Größe der Muskeln ist, dass sich im Nachhinein an den Proben nicht sicher nachvollziehen lässt, welcher Anteil des jeweiligen Muskels untersucht wurde. Gerade der Musculus quadriceps femoris enthält vier eigene große Untereinheiten: den Musculus vastus medialis, vastus lateralis, vastus intermedius und rectus femoris, die in ihrer Faserstruktur und somit auch in ihrer Titinkonfiguration durchaus Unterschiede aufweisen. Auch die Herzmuskulatur wird nicht vollends durch die Untersuchung des linksventrikulären Muskelgewebes repräsentiert. Hier wäre interessant zu untersuchen, wie sich die Titin-Phosphorylierungslevel rechtsventrikulär oder im Septum verhalten.

STZ-induzierter T1DM bei Ratten ist, wie schon in der Einleitung beschrieben, ein beliebtes und gut untersuchtes Modell. Dennoch gibt es auch einige Zweifel, ob es in jeder Hinsicht seinen Zweck erfüllt und nicht eventuell STZ als Pharmakon an sich die Skelett- und Herzmuskulatur beeinflusst.

Auf den myokardialen Apparat bezogen gibt es Hinweise, dass STZ einerseits durch oxidativen Stress und einen p38 MAP-Kinase-Weg schädigend einwirkt (Wold and Ren, 2004). Andererseits konnte auch nachgewiesen werden, dass auf funktionaler Ebene die durch STZ-induzierten T1DM pathologischen Veränderungen der Hämodynamik und passiven Steifigkeit einer frühen diabetischen Kardiomyopathie unter Insulintherapie in Ratten reversibel war (Litwin et al., 1990). Dies deutet daraufhin, dass die diabetische Kardiomyopathie auch in dem hier verwendeten STZ-Modell als diabetische Folgeerkrankung angesehen werden kann. Dabei bleiben Unsicherheiten, welchen Anteil STZ an den Veränderungen gerade auf molekularer Ebene hat.

Auf den Skelettmuskelapparat bezogen, gibt es eine Untersuchung, die zeigt, dass STZ einen dosisabhängigen Einfluss auf den Zellzyklus von Myoblasten hat (Johnston et al., 2007). Es kam zu einem Zellzyklusarrest. Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der Effekte, die man hier im Rahmen der diabetischen Myopathie beobachtet, auch mit dem Pharmakon STZ selbst in Verbindung gebracht werden können.

Schaut man sich nun an, inwieweit sich die in diesem STZ-T1DM-Modell gewonnenen Erkenntnisse auch auf T2DM übertragen lassen, muss man zunächst die metabolische Gesamtlage in Betracht ziehen. Sowohl bei T1DM als auch bei T2DM kommt es intrazellulär zu einem Glucosemangel, der durch Fettsäurenmetabolisierung zu kompensieren versucht wird. Die mitochondriale Energieproduktion ist in beiden Fällen herabgesetzt.

Betrachtet man nun kardial den funktionalen Aspekt, lässt sich erkennen, dass bei beiden diabetischen Erkrankungen die Herzfunktion systolisch und diastolisch eingeschränkt sein kann (Severson, 2004). Allerdings unterscheiden sich die T1DM- und T2DM-Modelle gerade in Bezug auf oxidativen Stress durchaus. Die Produktion von mitochondrialen Sauerstoffspezies ist in T2DM-Modellen deutlich erhöht (Herlein et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass sich nicht alle in diesem T1DM-Modell gewonnenen Erkenntnisse auch automatisch auf T2DM übertragen lassen. Allerdings ist es durchaus

zulässig, zu sagen, dass die hier gewonnen pathophysiologischen Hinweise auch im T2DM-Modell auftreten können.

Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse von diesem T1DM-Modell auf T2DM in Hinblick auf die Skelettmuskulatur ist noch weitaus schwieriger zu beurteilen, da es bisher wenige Untersuchungen gibt, die sich mit der diabetischen Myopathie insgesamt, geschweige denn mit dem Vergleich zwischen T1DM und T2DM beschäftigen. Unbestritten ist, dass sich bei T1DM und T2DM eine diabetische Myopathie feststellen lässt (Huang et al., 2010, Gordon et al., 2010). Diabetes mellitus hat also eine entscheidende Einwirkung auf die Skelettmuskulatur, die sich in T1DM und T2DM phänotypisch ähnlich äußert. Die Verknüpfung mit der Titinfunktion bleibt hingegen bislang unklar.

Die größte Frage hingegen ist, ob sich die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auch auf den Menschen übertragen lassen. Einerseits ist sicher, dass die pathophysiologischen Korrelate der diabetischen Kardiomyopathie mit diastolischer Dysfunktion genau wie die diabetische Myopathie bei Diabetes mellitus Patient*innen und im Tiermodell vorkommen (Schannwell et al., 2002, Gordon et al., 2010, Andersen, 1998). Und zusätzlich die untersuchten Titin-Serinreste repräsentativ für humane als auch für Nagetiermodelle sind, da sie evolutionär konserviert sind (Hidalgo et al., 2009). Andererseits dauert z.B. der Herzzyklus durch die viel höhere Herzfrequenz bei Nagetieren weniger lange, was natürlich auch mechanische/biochemische Auswirkungen haben kann. Außerdem erfahren die meisten Menschen mit T1DM eine Behandlung ihrer diabetischen Erkrankung, in der Regel durch Insulingabe. Deswegen sieht man das hier im STZ-Modell erzeugte Extrembild von Hyperglykämie und Insulinmangel unter klinischen Aspekten selten.

Insgesamt gibt es viele Hinweise, dass diese Arbeit einen kleinen Beitrag zur Entdeckung des Feldes der diabetischen Kardiomyopathie und diabetischen Myopathie leisten kann. Allerdings fehlen gerade auf molekularbiologischer Ebene viele Untersuchungen, die die Rolle von Titin in der Pathophysiologie der genannten diabetischen Folgeerkrankungen erörtern.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass T1DM die Phosphorylierung von Titin in Herz- und Skelettmuskulatur und damit wahrscheinlich auch

die passive Steifigkeit verändert. Einzelkraftmessungen könnten einen Hinweis dazu liefern, inwieweit sich die veränderte Titin-Phosphorylierung auch auf die passive Steifigkeit des Sarkomers niederschlägt. Dabei ist für die Herzmuskulatur relativ unbestritten, dass es zu einer Erhöhung der passiven Steifigkeit im Falle von Diabetes mellitus mit dem Korrelat der diastolischen Dysfunktion im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie kommt. In der Skelettmuskulatur hingegen sind die Auswirkungen von erhöhter oder erniedrigter passiver Titin-Steifigkeit auch in Hinblick auf die diabetische Myopathie noch weitestgehend ungeklärt. Deshalb lassen sich Gedankenspiele in Richtung eines therapeutischen Einsatzes der Veränderungen der Titin-Phosphorylierungskaskaden auch bisher nur bezüglich der Herzmuskulatur treffen. Hier sind die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen erhöhter passiver Muskelsteifigkeit und diastolischer Dysfunktion relativ klar. Wichtig wäre es, die Signalkaskaden, welche zu einer erhöhten S12022 Phosphorylierung führen, weiter zu erforschen, welche die wahrscheinlich maladaptive Veränderung der vermutlich im Verlauf erhöhten passiven Steifigkeit verursachen. Konkret wäre es interessant die Rolle von CamKII δ und ihre Wirkung auf Titin genauer zu beleuchten. Außerdem wäre hier nochmal wichtig zu schauen, warum sich die erhöhte S12022 Phosphorylierung in der linksventrikulären Muskulatur der STZ-Ratten nicht in einer erhöhten passiven Steifigkeit niederschlägt (Krüger et al., 2010). Hier stellt sich die Frage nach weiteren Kompensations- und Anpassungsmechanismen, die eine erhöhte vermutlich maladaptive Steifigkeitszunahme verhindern.

Eine wegweisende Studie bezüglich therapeutischer Ansatzpunkte wurde dabei von Hopf et al. (2018) veröffentlicht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das zu *epidermal growth factor family* gehörende Neuregulin-1 bei Diabetes mellitus und HFpEF die diastolische Dysfunktion vermindern konnte (Hopf et al., 2018). Eine weitere Idee wäre es, über eine Intervention im PKG-abhängigen Signalweg eine erhöhte Phosphorylierung in der N2-Bus zu erreichen, um die erhöhte titinbasierte diastolische Steifigkeit zu vermindern (Krüger et al., 2009).

Weiterhin ist bisher der Zusammenhang zwischen Titin, Diabetes mellitus und Muskelatrophie kaum untersucht. In den Mechanismen der Muskelatrophie könnten sich wichtige Hinweise für therapeutische Zielstrukturen verbergen, auch um dem Kraftverlust in der Skelettmuskulatur im Rahmen der diabetischen Myopathie vorzubeugen.

Ein weiteres Feld in dem noch Forschung nötig ist, ist das Verständnis von Titin und Titinphosphorylierung als Modulatoren der längenabhängigen Aktivierung und des Frank-Starling-Mechanismus und damit auch der aktiven Kraftentwicklung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass T1DM eine große Auswirkung auf die Titin-Phosphorylierung in Herz- und Skelettmuskulatur hat. Es muss allerdings noch geklärt werden, inwieweit sich dies auf die Funktion und passive Steifigkeit auswirkt. Klar ist allerdings, dass ein Schlüssel zur Therapie der durch Diabetes mellitus bedingten diastolischen Dysfunktion in der Modifikation von Titin als elementare Stellfeder des Sarkomers liegen könnte. Eine besondere Rolle wird dabei auch in Zukunft die Erforschung der Signalkaskaden spielen, die zur Titin-Modifikation in Krankheit und Gesundheit führen, um eines Tages therapeutisch an dieser Stelle intervenieren zu können und die muskelbezogenen diabetischen Folgeerkrankungen abzumildern.

5 Quellenverzeichnis

- ABDALLAH, Y., GKATZOFLIA, A., GLIGORIEVSKI, D., KASSECKERT, S., EULER, G., SCHLUTER, K. D., SCHAFFER, M., PIPER, H. M. & SCHAFFER, C. 2006. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res*, 70, 346-53.
- AIT MOU, Y., LE GUENNEC, J.-Y., MOSCA, E., DE TOMBE, P. P. & CAZORLA, O. 2008. Differential contribution of cardiac sarcomeric proteins in the myofibrillar force response to stretch. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 457, 25.
- AKULA, A., KOTA, M. K., GOPISETTY, S. G., CHITRAPU, R. V., KALAGARA, M., KALAGARA, S., VEERAVALLI, K. K. & GOMEDHIKAM, J. P. 2003. Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res*, 48, 429-35.
- ALEGRE-CEBOLLADA, J., KOSURI, P., GIGANTI, D., ECKELS, E., RIVAS-PARDO, J. A., HAMDANI, N., WARREN, C. M., SOLARO, R. J., LINKE, W. A. & FERNANDEZ, J. M. 2014. S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*, 156, 1235-1246.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2017. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 40, S11-S24.
- ANDERSEN, H. 1998. Muscular endurance in long-term IDDM patients. *Diabetes Care*, 21, 604-9.
- ANDERSEN, H., SCHMITZ, O. & NIELSEN, S. 2005. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med*, 22, 1401-7.
- ARAGNO, M., MASTROCOLA, R., CATALANO, M. G., BRIGNARDELLO, E., DANNI, O. & BOCCUZZI, G. 2004. Oxidative Stress Impairs Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. *Diabetes*, 53, 1082.
- ARBANAS, J., KLASAN, G. S., NIKOLIC, M., JERKOVIC, R., MILJANOVIC, I. & MALNAR, D. 2009. Fibre type composition of the human psoas major muscle with regard to the level of its origin. *Journal of anatomy*, 215, 636-641.
- BACKS, J., BACKS, T., NEEF, S., KREUSSER, M. M., LEHMANN, L. H., PATRICK, D. M., GRUETER, C. E., QI, X., RICHARDSON, J. A., HILL, J. A., KATUS, H. A., BASSEL-DUBY, R., MAIER, L. S. & OLSON, E. N. 2009. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2342-7.
- BANG, M. L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A. J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C. C., LABEIT, D., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & 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, 1065-72.
- BÄRTHLEIN, K. A. 2019. Der Einfluss von Metformin-Stimulation auf den Titin-Isoformen-Switch in embryonalen Rattenkardiomyozyten in Abhängigkeit von Autophagie-Aktivität und Expression des Spleißfaktors RBM20. *Dissertation, Humanmedizin, Düsseldorf*, urn:nbn:de:hbz:061-20190919-111448-1.
- BELKE, D. D., BETUING, S., TUTTLE, M. J., GRAVELEAU, C., YOUNG, M. E., PHAM, M., ZHANG, D., COOKSEY, R. C., MCCLAIN, D. A., LITWIN, S. E., TAEGTMEYER, H., SEVERSON, D., KAHN, C. R. & ABEL, E. D. 2002. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest*, 109, 629-39.
- BLUMENTHAL, D. K., STULL, J. T. & GILL, G. N. 1978. Phosphorylation of cardiac troponin by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 253, 324-6.
- BONNEVIE-NIELSEN, V., STEFFES, M. W. & LERNMARK, Å. 1981. A Major Loss in Islet Mass and B-cell Function Precedes Hyperglycemia in Mice Given Multiple Low Doses of Streptozotocin. *Diabetes*, 30, 424-429.

- BORBELY, A., FALCAO-PIRES, I., VAN HEEREBEEK, L., HAMDANI, N., EDES, I., GAVINA, C., LEITE-MOREIRA, A. F., BRONZWAER, J. G., PAPP, Z., VAN DER VELDEN, J., STIENEN, G. J. & PAULUS, W. J. 2009. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res*, 104, 780-6.
- BOTTAZZO, G. F., FLORIN-CHRISTENSEN, A. & DONIACH, D. 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2, 1279-83.
- BRYNNEL, A., HERNANDEZ, Y., KISS, B., LINDQVIST, J., ADLER, M., KOLB, J., VAN DER PIJL, R., GOHLKE, J., STROM, J., SMITH, J., OTTENHEIJM, C. & GRANZIER, H. L. 2018. Downsizing the molecular spring of the giant protein titin reveals that skeletal muscle titin determines passive stiffness and drives longitudinal hypertrophy. *Elife*, 7.
- BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), KASSENÄRZTLICHE BUNDESVEREINIGUNG (KBV) & (AWMF), A. D. W. M. F. 2014. Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014. Available from: www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de; [cited: 01.03.2021], AWMF-Registernummer nvl - 001g; DOI: 10.6101/AZQ/000213.
- CAZORLA, O., FREIBURG, A., HELMES, M., CENTNER, T., MCNABB, M., WU, Y., TROMBITAS, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2000. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*, 86, 59-67.
- 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, 1028-35.
- CORDELL, H. J. & TODD, J. A. 1995. Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet*, 11, 499-504.
- COSTILL, D. L., DANIELS, J., EVANS, W., FINK, W., KRAHENBUHL, G. & SALTIN, B. 1976. Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J Appl Physiol*, 40, 149-54.
- DE TOMBE, P. P., MATEJA, R. D., TACHAMPA, K., AIT MOU, Y., FARMAN, G. P. & IRVING, T. C. 2010. Myofilament length dependent activation. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 851-8.
- DESHPANDE, A. D., HARRIS-HAYES, M. & SCHOOTMAN, M. 2008. Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy*, 88, 1254-1264.
- ESC COMMITTEE, GUIDELINES, F. P., MEMBERS, A. T. F., RYDÉN, L., GRANT, P. J., ANKER, S. D., BERNE, C., COSENTINO, F., DANCHIN, N., DEATON, C., ESCANED, J., HAMMES, H.-P., HUIKURI, H., MARRE, M., MARX, N., MELLBIN, L., OSTERGREN, J., PATRONO, C., SEFEROVIC, P., UVA, M. S., TASKINEN, M.-R., TENDERA, M., TUOMILEHTO, J., VALENSI, P., ZAMORANO, J. L., ZAMORANO, J. L., ACHENBACH, S., BAUMGARTNER, H., BAX, J. J., BUENO, H., DEAN, V., DEATON, C., EROL, Ç., FAGARD, R., FERRARI, R., HASDAI, D., HOES, A. W., KIRCHHOF, P., KNUUTI, J., KOLH, P., LANCELLOTTI, P., LINHART, A., NIHOYANNOPOULOS, P., PIEPOLI, M. F., PONIKOWSKI, P., SIRNES, P. A., TAMARGO, J. L., TENDERA, M., TORBICKI, A., WIJNS, W., WINDECKER, S., DOCUMENT, R., DE BACKER, G., SIRNES, P. A., EZQUERRA, E. A., AVOGARO, A., BADIMON, L., BARANOVA, E., BAUMGARTNER, H., BETTERIDGE, J., CERIELLO, A., FAGARD, R., FUNCK-BRENTANO, C., GULBA, D. C., HASDAI, D., HOES, A. W., KJEKSHUS, J. K., KNUUTI, J., KOLH, P., LEV, E., MUELLER, C., NEYSES, L., NILSSON, P. M., PERK, J., PONIKOWSKI, P., REINER, Ž., SATTAR, N., SCHÄCHINGER, V., SCHEEN, A., SCHIRMER, H., STRÖMBERG, A., SUDZHAJEVA, S., TAMARGO, J. L., VIIGIMAA, M., VLACHOPOULOS, C. & XUEREBA, R. G. 2013. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD The Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European Heart Journal*, 34, 3035-3087.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J. S., GREGORIO, C. C., GRANZIER, H. & 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, 1114-21.
- FREUNDT, J. K. & LINKE, W. A. 2019. Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *J Appl Physiol (1985)*, 126, 1474-1482.
- FRIED, L. P. & GURALNIK, J. M. 1997. Disability in older adults: evidence regarding significance, etiology, and risk. *J Am Geriatr Soc*, 45, 92-100.
- FUKUDA, N., SASAKI, D., ISHIWATA, S. & KURIHARA, S. 2001. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*, 104, 1639-45.
- FUKUDA, N., WU, Y., FARMAN, G., IRVING, T. C. & GRANZIER, H. 2003. Titin isoform variance and length dependence of activation in skinned bovine cardiac muscle. *J Physiol*, 553, 147-54.
- FUNATSU, T., KONO, E., HIGUCHI, H., KIMURA, S., ISHIWATA, S., YOSHIOKA, T., MARUYAMA, K. & TSUKITA, S. 1993. Elastic filaments in situ in cardiac muscle: deep-etch replica analysis in combination with selective removal of actin and myosin filaments. *J Cell Biol*, 120, 711-24.
- FÜRST, D. O., OSBORN, M., NAVE, R. & WEBER, K. 1988. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 106, 1563-72.
- GAGNUM, V., STENE, L. C., JENSSEN, T. G., BERTEUSSEN, L. M., SANDVIK, L., JONER, G., NJOLSTAD, P. R. & SKRIVARHAUG, T. 2017. Causes of death in childhood-onset Type 1 diabetes: long-term follow-up. *Diabet Med*, 34, 56-63.
- GASTER, M., STAEHR, P., BECK-NIELSEN, H., SCHRODER, H. D. & HANDBERG, A. 2001. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes*, 50, 1324-9.
- GAUTEL, M. 2011. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch*, 462, 119-34.
- GOFFRIER, B., SCHULZ, M. & BÄTZING-FEIGENBAUM, J. 2017. Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015. *Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi)*, Versorgungsatlas-Bericht 17/03; DOI: 10.20364/VA-17.03.
- GONZALEZ-MORALES, N., HOLENKA, T. K. & SCHOCK, F. 2017. Filamin actin-binding and titin-binding fulfill distinct functions in Z-disc cohesion. *PLoS Genet*, 13, e1006880.
- GORDON, C. S., SERINO, A. S., KRAUSE, M. P., CAMPBELL, J. E., CAFARELLI, E., ADEGOKE, O. A., HAWKE, T. J. & RIDDELL, M. C. 2010. Impaired growth and force production in skeletal muscles of young partially pancreatectomized rats: a model of adolescent type 1 diabetic myopathy? *PLoS One*, 5, e14032.
- GRANZIER, H. L. & IRVING, T. C. 1995. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*, 68, 1027-44.
- GREGORIO, C. C., TROMBITAS, K., CENTNER, T., KOLMERER, B., STIER, G., KUNKE, K., SUZUKI, K., OBERMAYR, F., HERRMANN, B., GRANZIER, H., SORIMACHI, H. & LABEIT, S. 1998. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol*, 143, 1013-27.
- GRÜTZNER, A., GARCIA-MANYES, S., KÖTTER, 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, 825-34.
- GUO, W., ZHU, C., YIN, Z., WANG, Q., SUN, M., CAO, H. & GREASER, M. L. 2018. Splicing Factor RBM20 Regulates Transcriptional Network of Titin Associated and Calcium Handling Genes in The Heart. *Int J Biol Sci*, 14, 369-380.
- HAAK, T., GÖLZ, S., FRITSCH, A., FÜCHTENBUSCH, M., SIEGMUND, T., SCHNELLBÄCHER, E., KLEIN, H. H., UEBEL, T. & DROßEL, D. 2020. Therapie des Typ-1-Diabetes–Kurzfassung

- der S3-Leitlinie (AWMF-Registernummer: 057-013; 2. Auflage). *Diabetologie und Stoffwechsel*, 15, S40-S50.
- HAMDANI, N., KRYSIAK, J., KREUSSER, M. M., NEEF, S., DOS REMEDIOS, C. G., MAIER, L. S., KRUGER, M., BACKS, J. & 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, 664-74.
- HELMES, M., TROMBITAS, K., CENTNER, T., KELLERMAYER, M., LABEIT, S., LINKE, W. A. & GRANZIER, H. 1999. Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circ Res*, 84, 1339-52.
- HELMES, M., TROMBITAS, K. & GRANZIER, H. 1996. Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 79, 619-26.
- HERLEIN, J. A., FINK, B. D., O'MALLEY, Y. & SIVITZ, W. I. 2009. Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology*, 150, 46-55.
- HERZOG, W. 2018. The multiple roles of titin in muscle contraction and force production. *Biophysical reviews*, 10, 1187-1199.
- HIDALGO, C., HUDSON, B., BOGOMOLOVAS, J., ZHU, Y., ANDERSON, B., GREASER, M., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2009. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
- HIDALGO, C., SARIPALLI, C. & GRANZIER, H. L. 2014. Effect of exercise training on post-translational and post-transcriptional regulation of titin stiffness in striated muscle of wild type and IG KO mice. *Arch Biochem Biophys*, 552-553, 100-7.
- HIDALGO, C. G., CHUNG, C. S., SARIPALLI, C., METHAWASIN, M., HUTCHINSON, K. R., TSAPRAILIS, G., LABEIT, S., MATTIAZZI, A. & GRANZIER, H. L. 2013. The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- HÖLSCHER, M. E., BODE, C. & BUGGER, H. 2016. Diabetic Cardiomyopathy: Does the Type of Diabetes Matter? *International journal of molecular sciences*, 17, 2136.
- HOPF, A. E., ANDRESEN, C., KOTTER, S., ISIC, M., ULRICH, K., SAHIN, S., BONGARDT, S., ROLL, W., DROVE, F., SCHEERER, N., VANDEKERCKHOVE, L., DE KEULENAER, G. W., HAMDANI, N., LINKE, W. A. & 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, 342-355.
- HOROWITS, R. & PODOLSKY, R. J. 1988. Thick filament movement and isometric tension in activated skeletal muscle. *Biophysical Journal*, 54, 165-171.
- HUANG, B. K., MONU, J. U. & DOUMANIAN, J. 2010. Diabetic myopathy: MRI patterns and current trends. *AJR Am J Roentgenol*, 195, 198-204.
- HUTTLIN, E. L., JEDRYCHOWSKI, M. P., ELIAS, J. E., GOSWAMI, T., RAD, R., BEAUSOLEIL, S. A., VILLEN, J., HAAS, W., SOWA, M. E. & GYGI, S. P. 2010. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*, 143, 1174-89.
- ISLAS-ANDRADE, S., MONSALVE, M. C. R., PE, N. TILDE, A. J. E. D. L., POLANCO, A. C., PALOMINO, M. A. & VELASCO, A. F. 2000. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of the Two Models in Rats. *ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA*, 33, 201-208.
- JOHNSON, D. D., PALUMBO, P. J. & CHU, C. P. 1980. Diabetic ketoacidosis in a community-based population. *Mayo Clin Proc*, 55, 83-8.
- JOHNSTON, A. P., CAMPBELL, J. E., FOUND, J. G., RIDDELL, M. C. & HAWKE, T. J. 2007. Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C1033-40.
- JOUMAA, V., RASSIER, D. E., LEONARD, T. R. & HERZOG, W. 2008. The origin of passive force enhancement in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, C74-8.

- KALYANI, R. R., SAUDEK, C. D., BRANCATI, F. L. & SELVIN, E. 2010. Association of diabetes, comorbidities, and A1C with functional disability in older adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2006. *Diabetes Care*, 33, 1055-60.
- KANNEL, W. B. & MCGEE, D. L. 1979. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *Jama*, 241, 2035-8.
- KARAKELIDES, H., ASMANN, Y. W., BIGELOW, M. L., SHORT, K. R., DHATARIYA, K., COENEN-SCHIMKE, J., KAHL, J., MUKHOPADHYAY, D. & NAIR, K. S. 2007. Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects. *Diabetes*, 56, 2683-9.
- KELLEHER, A. R., FAIRCHILD, T. J. & KESLACY, S. 2010. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF-kappaB canonical cascade activation. *Acta Diabetol*, 47, 315-23.
- KOHN, T. A. & MYBURGH, K. H. 2007. Regional specialization of rat quadriceps myosin heavy chain isoforms occurring in distal to proximal parts of middle and deep regions is not mirrored by citrate synthase activity. *Journal of anatomy*, 210, 8-18.
- KONHILAS, J. P., IRVING, T. C. & DE TOMBE, P. P. 2002. Length-dependent activation in three striated muscle types of the rat. *J Physiol*, 544, 225-36.
- KOSER, F., LOESCHER, C. & LINKE, W. A. 2019. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? *The FEBS journal*, 286, 2240-2260.
- KÖTTER, S., ANDRESEN, C. & KRÜGER, M. 2014. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 395, 1341-52.
- KÖTTER, S., GOUT, L., VON FRIELING-SALEWSKY, M., MÜLLER, A. E., HELING, S., MARCUS, K., DOS REMEDIOS, C., LINKE, W. A. & KRÜGER, M. 2013. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
- KÖTTER, S., KAZMIEROWSKA, M., ANDRESEN, C., BOTTERMANN, K., GRANDOCH, M., GORRESSEN, S., HEINEN, A., MOLL, J. M., SCHELLER, J., GÖDECKE, A., FISCHER, J. W., SCHMITT, J. P. & KRÜGER, M. 2016. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res*, 119, 1017-1029.
- KRAUSE, M. P., RIDDELL, M. C., GORDON, C. S., IMAM, S. A., CAFARELLI, E. & HAWKE, T. J. 2009. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita+/- and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *J Appl Physiol (1985)*, 106, 1650-9.
- KRÜGER, M., BABICZ, K., VON FRIELING-SALEWSKY, M. & LINKE, W. A. 2010. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 910-6.
- KRÜGER, M. & KÖTTER, S. 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Frontiers in physiology*, 7, 76-76.
- KRÜGER, M., KÖTTER, S., GRÜTZNER, A., LANG, P., ANDRESEN, C., REDFIELD, M. M., BUTT, E., DOS REMEDIOS, C. G. & LINKE, W. A. 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 104, 87-94.
- KUO, H. K., AL SNIH, S., KUO, Y. F. & RAJI, M. A. 2011. Cross-sectional associations of albuminuria and C-reactive protein with functional disability in older adults with diabetes. *Diabetes Care*, 34, 710-7.
- LABEIT, D., WATANABE, K., WITT, C., FUJITA, H., WU, Y., LAHMERS, S., FUNCK, T., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2003. Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13716-21.
- LABEIT, S., GAUTEL, M., LAKEY, A. & TRINICK, J. 1992. Towards a molecular understanding of titin. *Embo j*, 11, 1711-6.

- LABEIT, S. & KOLMERER, B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270, 293-6.
- LEITE, F. S., MINOZZO, F. C., KALGANOV, A., CORNACHIONE, A. S., CHENG, Y. S., LEU, N. A., HAN, X., SARIPALLI, C., YATES, J. R., 3RD, GRANZIER, H., KASHINA, A. S. & RASSIER, D. E. 2016. Reduced passive force in skeletal muscles lacking protein arginylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 310, C127-35.
- LESNIEWSKI, L. A., MILLER, T. A. & ARMSTRONG, R. B. 2003. Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 28, 493-500.
- LI, S., GUO, W., SCHMITT, B. M. & GREASER, M. L. 2012. Comprehensive analysis of titin protein isoform and alternative splicing in normal and mutant rats. *J Cell Biochem*, 113, 1265-73.
- LI, Y., LANG, P. & LINKE, W. A. 2016. Titin stiffness modifies the force-generating region of muscle sarcomeres. *Scientific Reports*, 6, 24492.
- LIND, M., BOUNIAS, I., OLSSON, M., GUDBJORNSDOTTIR, S., SVENSSON, A. M. & ROSENGREN, A. 2011. Glycaemic control and incidence of heart failure in 20,985 patients with type 1 diabetes: an observational study. *Lancet*, 378, 140-6.
- LING, H., ZHANG, T., PEREIRA, L., MEANS, C. K., CHENG, H., GU, Y., DALTON, N. D., PETERSON, K. L., CHEN, J., BERS, D. & BROWN, J. H. 2009. Requirement for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest*, 119, 1230-40.
- LINKE, W. A. & GRÜTZNER, A. 2008. Pulling single molecules of titin by AFM—recent advances and physiological implications. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 456, 101-115.
- LINKE, W. A. & HAMDANI, N. 2014. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*, 114, 1052-68.
- LINKE, W. A., IVEMEYER, M., MUNDEL, P., STOCKMEIER, M. R. & KOLMERER, B. 1998a. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8052-7.
- 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, 62-71.
- 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, 631-44.
- LINKE, W. A., STOCKMEIER, M. R., IVEMEYER, M., HOSSER, H. & MUNDEL, P. 1998b. Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *J Cell Sci*, 111 (Pt 11), 1567-74.
- LITWIN, S. E., RAYA, T. E., ANDERSON, P. G., DAUGHERTY, S. & GOLDMAN, S. 1990. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-diabetic rat. Changes in active and passive properties of the left ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, 86, 481-488.
- LIU, J. X., HOGLUND, A. S., KARLSSON, P., LINDBLAD, J., QAISAR, R., AARE, S., BENGTSSON, E. & LARSSON, L. 2009. Myonuclear domain size and myosin isoform expression in muscle fibres from mammals representing a 100,000-fold difference in body size. *Exp Physiol*, 94, 117-29.
- LUNDBY, A., SECHER, A., LAGE, K., NORDSBORG, N. B., DMYTRIYEV, A., LUNDBY, C. & OLSEN, J. V. 2012. Quantitative maps of protein phosphorylation sites across 14 different rat organs and tissues. *Nat Commun*, 3, 876.
- MAKARENKO, I., OPITZ, C. A., LEAKE, M. C., NEAGOE, C., KULKE, M., GWATHMEY, J. K., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2004. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*, 95, 708-16.
- MALISOUX, L., FRANCAUX, M., NIELENS, H. & THEISEN, D. 2006. Stretch-shortening cycle exercises: an effective training paradigm to enhance power output of human single muscle fibers. *J Appl Physiol (1985)*, 100, 771-9.

- MÁRTONFALVI, Z. & KELLERMAYER, M. 2014. Individual globular domains and domain unfolding visualized in overstretched titin molecules with atomic force microscopy. *PLoS one*, 9, e85847-e85847.
- MATEJA, R. D., GREASER, M. L. & DE TOMBE, P. P. 2013. Impact of titin isoform on length dependent activation and cross-bridge cycling kinetics in rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833, 804-811.
- MCBRIDE, J. M., TRIPLETT-MCBRIDE, T., DAVIE, A. J., ABERNETHY, P. J. & NEWTON, R. U. 2003. Characteristics of titin in strength and power athletes. *Eur J Appl Physiol*, 88, 553-7.
- MCDERMOTT, M. M., GURALNIK, J. M., ALBAY, M., BANDINELLI, S., MINIATI, B. & FERRUCCI, L. 2004. Impairments of muscles and nerves associated with peripheral arterial disease and their relationship with lower extremity functioning: the InCHIANTI Study. *J Am Geriatr Soc*, 52, 405-10.
- MILJKOVIC-GACIC, I., WANG, X., KAMMERER, C. M., GORDON, C. L., BUNKER, C. H., KULLER, L. H., PATRICK, A. L., WHEELER, V. W., EVANS, R. W. & ZMUDA, J. M. 2008. Fat infiltration in muscle: new evidence for familial clustering and associations with diabetes. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 1854-60.
- MOGENSEN, M., SAHLIN, K., FERNSTROM, M., GLINTBORG, D., VIND, B. F., BECK-NIELSEN, H. & HOJLUND, K. 2007. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 56, 1592-9.
- MÜLLER, A. E., KREINER, M., KÖTTER, S., LASSAK, P., BLOCH, W., SUHR, F. & KRÜGER, M. 2014. Acute exercise modifies titin phosphorylation and increases cardiac myofibrillar stiffness. *Frontiers in Physiology*, 5.
- MUTUNGI, G., TRINICK, J. & RANATUNGA, K. W. 2003. Resting tension characteristics in differentiating intact rat fast- and slow-twitch muscle fibers. *J Appl Physiol (1985)*, 95, 2241-7.
- NAGY, A., CACCIAFESTA, P., GRAMA, L., KENGYEL, A., MALNASI-CSIZMADIA, A. & KELLERMAYER, M. S. 2004. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal muscle titin. *J Cell Sci*, 117, 5781-9.
- NEAGOE, C., KULKE, M., DEL MONTE, F., GWATHMEY, J. K., DE TOMBE, P. P., HAJJAR, R. J. & LINKE, W. A. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 106, 1333-41.
- 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, 175-89.
- NEDRUD, J., LABELLE, S., GOTTHARDT, M. & GRANZIER, H. 2011. Mechanics on myocardium deficient in the N2B region of titin: the cardiac-unique spring element improves efficiency of the cardiac cycle. *Biophys J*, 101, 1385-92.
- NICHOLS, G. A., GULLION, C. M., KORO, C. E., EPHROSS, S. A. & BROWN, J. B. 2004. The incidence of congestive heart failure in type 2 diabetes: an update. *Diabetes Care*, 27, 1879-84.
- NOLAND, T. A., JR., RAYNOR, R. L. & KUO, J. F. 1989. Identification of sites phosphorylated in bovine cardiac troponin I and troponin T by protein kinase C and comparative substrate activity of synthetic peptides containing the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 264, 20778-85.
- PARK, S. W., GOODPASTER, B. H., LEE, J. S., KULLER, L. H., BOUDREAU, R., DE REKENEIRE, N., HARRIS, T. B., KRITCHEVSKY, S., TYLAVSKY, F. A., NEVITT, M., CHO, Y. W. & NEWMAN, A. B. 2009. Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32, 1993-7.
- PARK, S. W., GOODPASTER, B. H., STROTMAYER, E. S., DE REKENEIRE, N., HARRIS, T. B., SCHWARTZ, A. V., TYLAVSKY, F. A. & NEWMAN, A. B. 2006. Decreased muscle strength and quality in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes*, 55, 1813-8.

- PATTERSON, C. C., GYÜRÜS, E., ROSENBAUER, J., CINEK, O., NEU, A., SCHOBER, E., PARSLAW, R. C., JONER, G., SVENSSON, J., CASTELL, C., BINGLEY, P. J., SCHOENLE, E., JAROSZ-CHOBOT, P., URBONAITÉ, B., ROTHE, U., KRZISNIK, C., IONESCU-TIRGOVISTE, C., WEETS, I., KOCOVA, M., STIPANCIC, G., SAMARDZIC, M., DE BEAUFORT, C. E., GREEN, A., DAHLQUIST, G. G. & SOLTÉSZ, G. 2012. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989–2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*, 55, 2142-2147.
- PAULUS, W. J., TSCHÖPE, C., SANDERSON, J. E., RUSCONI, C., FLACHSKAMPF, F. A., RADEMAKERS, F. E., MARINO, P., SMISETH, O. A., DE KEULENAER, G., LEITE-MOREIRA, A. F., BORBELY, A., EDES, I., HANDOKO, M. L., HEYMANS, S., PEZZALI, N., PIESKE, B., DICKSTEIN, K., FRASER, A. G. & BRUTSAERT, D. L. 2007. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 28, 2539-50.
- PIRODDI, N., BELUS, A., SCELLINI, B., TESI, C., GIUNTI, G., CERBAI, E., MUGELLI, A. & POGGESI, C. 2007. Tension generation and relaxation in single myofibrils from human atrial and ventricular myocardium. *Pflugers Arch*, 454, 63-73.
- POIRIER, P., BOGATY, P., GARNEAU, C., MAROIS, L. & DUMESNIL, J. G. 2001. Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care*, 24, 5-10.
- 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, 461-80.
- PUNKT, K. 2002. Fibre types in skeletal muscles. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 162, lii-xv, 1-109.
- RAEV, D. C. 1994. Which left ventricular function is impaired earlier in the evolution of diabetic cardiomyopathy? An echocardiographic study of young type I diabetic patients. *Diabetes Care*, 17, 633-9.
- RASKIN, A., LANGE, S., BANARES, K., LYON, R. C., ZIESENISS, A., LEE, L. K., YAMAZAKI, K. G., GRANZIER, H. L., GREGORIO, C. C., MCCULLOCH, A. D., OMENS, J. H. & 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, 29273-84.
- RIEF, M., GAUTEL, M., OESTERHELT, F., FERNANDEZ, J. M. & GAUB, H. E. 1997. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276, 1109-12.
- RIVAS-PARDO, JAIME A., ECKELS, EDWARD C., POPA, I., KOSURI, P., LINKE, WOLFGANG A. & FERNÁNDEZ, JULIO M. 2016. Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction. *Cell Reports*, 14, 1339-1347.
- ROSENGREN, A., VESTBERG, D., SVENSSON, A. M., KOSIBOROD, M., CLEMENTS, M., RAWSHANI, A., PIVODIC, A., GUDBJORNSDOTTIR, S. & LIND, M. 2015. Long-term excess risk of heart failure in people with type 1 diabetes: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3, 876-85.
- RUBLER, S., DLUGASH, J., YUCEOGLU, Y. Z., KUMRAL, T., BRANWOOD, A. W. & GRISHMAN, A. 1972. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol*, 30, 595-602.
- SANCHEZ, O. A., SNOW, L. M., LOWE, D. A., SERFASS, R. C. & THOMPSON, L. V. 2005. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. *J Appl Physiol (1985)*, 99, 472-8.
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KIM, D. H., GUERTIN, D. A., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & SABATINI, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14, 1296-302.

- SCHANNWELL, C. M., SCHNEPPENHEIM, M., PERINGS, S., PLEHN, G. & STRAUER, B. E. 2002. Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology*, 98, 33-9.
- SCHNEDL, W. J., FERBER, S., JOHNSON, J. H. & NEWGARD, C. B. 1994. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, 43, 1326-1333.
- SEVERSON, D. L. 2004. Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 82, 813-23.
- SHAPIRO, B. P., LAM, C. S., PATEL, J. B., MOHAMMED, S. F., KRUGER, M., MEYER, D. M., LINKE, W. A. & REDFIELD, M. M. 2007. Acute and chronic ventricular-arterial coupling in systole and diastole: insights from an elderly hypertensive model. *Hypertension*, 50, 503-11.
- STARON, R. S., HAGERMAN, F. C., HIKIDA, R. S., MURRAY, T. F., HOSTLER, D. P., CRILL, M. T., RAGG, K. E. & TOMA, K. 2000. Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem*, 48, 623-9.
- STARON, R. S. & PETTE, D. 1987. Nonuniform myosin expression along single fibers of chronically stimulated and contralateral rabbit tibialis anterior muscles. *Pflugers Arch*, 409, 67-73.
- STUMP, C. S., SHORT, K. R., BIGELOW, M. L., SCHIMKE, J. M. & NAIR, K. S. 2003. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7996-8001.
- SULLIVAN, S. M. & PITTMAN, R. N. 1987. Relationship between mitochondrial volume density and capillarity in hamster muscles. *Am J Physiol*, 252, H149-55.
- TAKIMOTO, E., SOERGEL, D. G., JANSSEN, P. M., STULL, L. B., KASS, D. A. & MURPHY, A. M. 2004. Frequency- and afterload-dependent cardiac modulation in vivo by troponin I with constitutively active protein kinase A phosphorylation sites. *Circ Res*, 94, 496-504.
- TROMBITAS, K., GREASER, M., LABEIT, S., JIN, J. P., KELLERMAYER, M., HELMES, M. & GRANZIER, H. 1998. Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol*, 140, 853-9.
- TUOMILEHTO, J. 2013. The emerging global epidemic of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*, 13, 795-804.
- UNGER, A., BECKENDORF, L., BÖHME, P., KLEY, R., VON FRIELING-SALEWSKY, M., LOCHMÜLLER, H., SCHRÖDER, R., FÜRST, D. O., VORGERD, M. & LINKE, W. A. 2017. Translocation of molecular chaperones to the titin springs is common in skeletal myopathy patients and affects sarcomere function. *Acta Neuropathologica Communications*, 5, 72.
- VAN HEEREBEEK, L., HAMDANI, N., HANDOKO, M. L., FALCAO-PIRES, I., MUSTERS, R. J., KUPREISHVILI, K., IJSSELMUIDEN, A. J., SCHALKWIJK, C. G., BRONZWAER, J. G., DIAMANT, M., BORBELY, A., VAN DER VELDEN, J., STIENEN, G. J., LAARMAN, G. J., NIESSEN, H. W. & PAULUS, W. J. 2008. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*, 117, 43-51.
- VAN HEES, H. W., SCHELLEKENS, W. J., ANDRADE ACUÑA, G. L., LINKELS, M., HAFMANS, T., OTTENHEIJM, C. A., GRANZIER, H. L., SCHEFFER, G. J., VAN DER HOEVEN, J. G., DEKHUIJZEN, P. N. & HEUNKS, L. M. 2012. Titin and diaphragm dysfunction in mechanically ventilated rats. *Intensive Care Med*, 38, 702-9.
- VIKHOREV, P. G., VIKHOREVA, N. N., YEUNG, W., LI, A., LAL, S., DOS REMEDIOS, C. G., BLAIR, C. A., GUGLIN, M., CAMPBELL, K. S., YACOUB, M. H., DE TOMBE, P. & MARSTON, S. B. 2020. Titin-truncating mutations associated with dilated cardiomyopathy alter length-dependent activation and its modulation via phosphorylation. *Cardiovascular Research*, cvaa316, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa316>.

- VLAHOVIC, H., BAZDARIC, K., MARIJANCIC, V., SOIC-VRANIC, T., MALNAR, D. & ARBANAS, J. 2017. Segmental fibre type composition of the rat iliopsoas muscle. *Journal of anatomy*, 230, 542-548.
- VOLPATO, S., BIANCHI, L., LAURETANI, F., LAURETANI, F., BANDINELLI, S., GURALNIK, J. M., ZULIANI, G. & FERRUCCI, L. 2012. Role of muscle mass and muscle quality in the association between diabetes and gait speed. *Diabetes Care*, 35, 1672-9.
- WANG, C. P. & HAZUDA, H. P. 2011. Better glycemic control is associated with maintenance of lower-extremity function over time in Mexican American and European American older adults with diabetes. *Diabetes Care*, 34, 268-73.
- WANG, M., YIP, G. W., WANG, A. Y., ZHANG, Y., HO, P. Y., TSE, M. K., LAM, P. K. & SANDERSON, J. E. 2003. Peak early diastolic mitral annulus velocity by tissue Doppler imaging adds independent and incremental prognostic value. *J Am Coll Cardiol*, 41, 820-6.
- WARREN, C. M., KRZESINSKI, P. R., CAMPBELL, K. S., MOSS, R. L. & GREASER, M. L. 2004. Titin isoform changes in rat myocardium during development. *Mech Dev*, 121, 1301-12.
- WIDRICK, J. J., STELZER, J. E., SHOEPE, T. C. & GARNER, D. P. 2002. Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283, R408-16.
- WOLD, L. E. & REN, J. 2004. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 1066-71.
- ZENG, G., NYSTROM, F. H., RAVICHANDRAN, L. V., CONG, L. N., KIRBY, M., MOSTOWSKI, H. & QUON, M. J. 2000. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*, 101, 1539-45.
- ZHENG, Y., LEY, S. H. & HU, F. B. 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14, 88-98.
- ZHU, C., YIN, Z., TAN, B. & GUO, W. 2017. Insulin regulates titin pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner. *Biochimica et biophysica acta*, 1863, 2363-2371.
- ZILE, M. R., BAICU, C. F. & GAASCH, W. H. 2004. Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med*, 350, 1953-9.

Danksagung

Ein langer, lehrreicher und auch steiniger Weg geht an dieser Stelle für mich zu Ende. Ein Dank geht dabei an alle Menschen, die mich in dieser Zeit mit Höhen und Tiefen begleitet haben.

Allen voran möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger bedanken, die mir die Chance gegeben hat zu promovieren. Sie hat mich in meiner Arbeit immer unterstützt und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Weiterhin geht ein besonderer Dank an Dr. Sebastian Kötter (Sepp) und Sabine Bongardt, die mich im Labor an die Hand genommen und nicht zuletzt auch musikalisch geprägt haben. Ich bin dankbar für die leichten Stunden und den β -Mercaptoethanol-Geruch, die ich während der Arbeit oder im Urlaub mit meiner lieben Freundin und Weggefährtin Dr. med. (!) Katharina Bärthlein verbringen konnte. Ich bin froh, diese wertvolle Zeit geteilt zuhaben. Nicht zu vergessen sind dabei auch Senem, Gosia, Celerina, David und Philipp.

Ein ganz persönlicher Dank geht an meine Freund*innen, Lektor*innen und Berater*innen, die sich immer wieder für Orthografie und Kommasetzung engagierten und kritische Anmerkungen und Tipps und Tricks teilten. Dies gilt besonders Janosch, Helge, Theresa, Marie, Lilo, Doris und Linda. Danke, dass ihr euch die Zeit genommen habt.

Danke an meine Mitbewohner*innen Nic, Uli, Maxi und Piet, die meine Launen nach langen Stunden zwischen Acetongeruch und Grafikdesign zu Hause ertragen mussten.

Last but not least danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich mit ihrem steten und liebevollen „Wie läuft’s denn eigentlich mit der Doktorarbeit?“ haben am Ball bleiben lassen.