

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

Diabetes Mellitus und der Einfluss auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle sowie auf den
Abbau des sarkomerischen Proteins Titin in der Skelettmuskulatur

Dissertation

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

Vorgelegt von
Verena Amira Bormann

2021

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Schmitt

Für meinen Vater.

ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)

Die Erkrankung Diabetes Mellitus stellt ein globales Gesundheitsproblem dar. Der Stoffwechselerkrankung liegt eine chronische Hyperglykämie zugrunde, die entweder auf eine fehlende Insulinproduktion (T1DM) oder eine inadäquate Insulinwirkung (T2DM) zurück zu führen ist. Die Entwicklung von Muskelschwund und Funktionsverlust stellen zentrale Symptome dar und stehen möglicherweise mit einer gestörten Protein-Qualitäts-Kontrolle in Verbindung. Ziel dieser Arbeit war, anhand von Typ-1 und Typ-2 diabetischen Rattenmodellen die Aktivität der Autophagie und des Ubiquitin-Proteasom-Systems zu messen. Außerdem sollte der Abbau des Titinfilaments über die Quantifizierung des Titin Turnovers und der Titin Ubiquitinierung untersucht werden. Hierfür wurden Westernblot Analysen und Proteasomaktivitätsmessungen im Musculus Psoas und Musculus Quadriceps durchgeführt. Im T1DM Modell des M. Psoas zeigte sich eine Überlastung des Autophagolysosomalen-Systems sowie eine Erhöhung der proteasomalen Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Außerdem konnte ein erhöhter Titinturnover nachgewiesen werden. Die erhöhte Proteasomaktivität im T1DM des M. Psoas wurde als Kompensationsversuch zum Ausgleich der autophagischen Kapazitätsauslastung interpretiert. Möglicherweise führt die Typ-1 diabetische Stoffwechsellage darüber hinaus zu einem Stabilitätsverlust des Titinfilaments und erhöht dessen Umsatz. Im T2DM konnten keine wesentlichen Veränderungen in der Proteolyse detektiert werden. Hier kann möglicherweise von einem adaptiven Mechanismus ausgegangen werden, der durch zelluläre Gewöhnung an die chronische Hyperglykämie entsteht. Klinisch spiegelt sich dies darin wider, dass Typ-2 Diabetiker im Vergleich zu Typ-1 Diabetikern unter einem wesentlich geringeren Verlust an Muskelmasse und -funktion leiden. Insgesamt stellten sich im Vergleich der beiden Muskeln im M. Psoas eindeutige Veränderungen dar. Dieser ist bei der Ratte als schneller Muskel bekannt und setzt sich weitestgehend aus Typ-II glykolytischen Fasern zusammen. Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer im Vergleich zum M. Quadriceps verringerten Kapazität der Glukoseaufnahme, einer erhöhten Überladung mit glykierten Proteinen und einer erhöhten zellulären Stimulation der Proteolyse.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die beiden Hauptdiabetesformen in ihrer Wirkung auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle im Skelettmuskel stark unterscheiden. Der T1DM zeigt hierbei deutlichere Veränderungen in der Proteolyse, wodurch die stärker ausgeprägte Muskelschwäche zumindest partiell erklärt werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)

Diabetes mellitus represents a global health issue. The metabolic disease is based on a chronic hyperglycaemia, which is either due to a lack of insulin production (T1DM) or inadequate insulin action (T2DM). The development of muscle wasting and loss of function are key symptoms and may be associated with impaired protein quality control. The aim of this study was to measure the activity of autophagy and the ubiquitin-proteasome system using type-1 and type-2 diabetic rat models. In addition, the degradation of the titin filament was to be investigated by quantifying titin turnover and titin ubiquitination. For this purpose, westernblot analyses and proteasome activity measurements were performed in the psoas and quadriceps muscles. In the T1DM model of the psoas muscle, an overload of the autophagolysosomal system and an increase in the proteasomal activity of the ubiquitin-proteasome-system were found. In addition, an increased titin turnover could be detected. The increased proteasome activity in the T1DM of the psoas muscle was interpreted as a compensatory attempt to balance autophagic capacity utilisation. It is possible that the type-1 diabetic metabolic state also leads to a loss of stability of the titin filament and increases its turnover. In T2DM, no significant changes in proteolysis could be detected. Here, an adaptive mechanism can possibly be assumed, which arises through cellular habituation to chronic hyperglycaemia. Clinically, this is reflected by the fact that type-2 diabetics suffer from a significantly lower loss of muscle mass and function compared to type 1-diabetics. In comparison to the quadriceps muscle, clearer changes could be detected in the psoas muscle. This is known to be a fast muscle in the rat and is largely composed of type-II glycolytic fibres. This may be related to a comparatively reduced capacity for glucose uptake, increased overload of glycated proteins and increased cellular stimulation of proteolysis.

In summary, the two main forms of diabetes differ greatly in their effect on protein quality control in skeletal muscle. T1DM shows more marked changes in proteolysis, which can at least partially explain the more pronounced muscle weakness.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
ALS	Autophagolysosomales-System
AMPKα	AMP-aktivierte Proteinkinase alpha
ATG	<i>Autophagy related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BH4	Tetrahydrobiopterin
DTT	Dithiothreitol
Et al.	Et alii (und andere)
FIP200	<i>Focal-adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa</i>
FoXO	<i>Forkhead-Box-O</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTPCH	GTP-Cyclohydrolase
H₂O_{bidest}	Zweifach destilliertes Wasser
HbA1C	Hämoglobin A1c
HCL	Salzsäure
L	Liter
M.	Musculus
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Musculus	Muskel
N2-B_{us}	<i>N2-B unique sequence</i>
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEVK	Prolin, Glutamat, Vain, Lysin

pH	Potentia hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-Inositol-1,4,5-triphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat polyacrylamide</i>)
SEM	Standardfehler
SHHF	<i>Spontaneously hypertensive heart failure</i>
STZ	Streptozytocin
SQSTM1	Sequestosome-1
T1DM	Typ-1 Diabetes Mellitus
T2DM	Typ-2 Diabetes Mellitus
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
ULK	<i>Uncoordinated-51 Like Kinase</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
us	<i>Unique sequence</i>
ZSF-1	Zucker fatty /spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Diabetes Mellitus.....	1
1.1.1	Definition und Einteilung	1
1.1.2	Einfluss des Diabetes Mellitus auf die Skelett- und Herzmuskulatur.....	2
1.2	Die Protein-Qualitäts-Kontrolle innerhalb der Skelettmuskelzelle	3
1.2.1	Das Autophagolysosomale-System (ALS)	3
1.2.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	7
1.2.3	Der Crosstalk zwischen ALS und UPS	8
1.3	Das Sarkomer	9
1.3.1	Die Myofilamente	9
1.3.2	Der schematische Aufbau des Sarkomers.....	9
1.4	Titin	11
1.4.1	Molekularer Aufbau	11
1.4.2	Expression der Isoformen	11
1.4.3	Sarkomerische Funktion	12
1.4.4	Titin und die sarkomerische Protein-Qualitäts-Kontrolle	13
1.5	Vergleich der Muskeln.....	14
1.6	Zielsetzung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien.....	17
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	18
2.1.3	Antikörper.....	20
2.1.4	Kits	21
2.1.5	Laborgeräte.....	22
2.2	Methoden	24
2.2.1	Westernblotverfahren.....	24
2.2.2	Proteasom Assay	29
3	ERGEBNISSE.....	32
3.1	Auswirkungen des Diabetes Mellitus auf das Autophagolysosomale-System	32
3.1.1	Signifikant erhöhte LC3-II Level im M. Psoas und M. Quadriceps der STZ-Ratten (T1DM Modell)	32

3.1.2	p62/SQSTM1 Level.....	34
3.1.3	Aktivitätsniveau der mTOR und AMP-Kinase alpha	35
3.2	Auswirkung des Diabetes Mellitus auf die K63-abhängige Titinubiquitinierung und den Titin Turnover	36
3.2.1	Signifikant erhöhter Titin Turnover im T1DM Modell	37
3.3	Auswirkungen des Diabetes Mellitus auf die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems.....	38
3.3.1	PSMA2 Level.....	38
3.3.2	Messung der Proteasom Aktivität.....	40
3.4	Auswirkungen des Diabetes Mellitus auf die K48-abhängige Titinubiquitinierung.....	42
3.4.1	Marginale Veränderung der K48 Titin-Ubiquitinierung.....	42
3.5	Größenvergleich von Titin im Skelettmuskel.....	43
4	DISKUSSION	44
4.1	Messung des autophagischen Flusses.....	44
4.2	Insulinwirkung im diabetischen Skelettmuskel	45
4.3	Effekte des T1DM auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle.....	45
4.3.1	Das Autophagolysosomale-System.....	45
4.3.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	47
4.4	Effekte des T2DM auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle.....	48
4.4.1	Das Autophagolysosomale-System.....	48
4.4.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	49
4.5	Klinischer Bezug	50
4.5.1	Kontrolle der Muskelmasse bei T1DM und T2DM	50
4.6	Titin	51
4.6.1	K63 Ubiquitinierung und Titin Turnover	51
4.6.2	K48 Ubiquitinierung und Titin Turnover	52
4.7	Vergleich der Muskelgewebe	52
4.8	Zusammenfassung & Ausblick.....	55
5	LITERATUR- UND QUELLEN-VERZEICHNIS.....	57
6	ANHANG	72
6.1	Abbildungsverzeichnis	72
6.2	Tabellenverzeichnis.....	72

1 EINLEITUNG

1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1 Definition und Einteilung

Diabetes Mellitus bezeichnet eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, deren gemeinsames Merkmal eine Erhöhung der Blutglukose über den Normalwert ist (Harreiter and Roden, 2019). Aktuell sind in Deutschland mindestens 7,2% der Bevölkerung an Diabetes erkrankt und auch in Zukunft muss mit einem weiteren Anstieg der Diabetesprävalenz gerechnet werden (Tönnies et al., 2019).

Seit dem Jahr 1936 wird hauptsächlich der Typ-1 (T1DM) vom Typ-2 Diabetes Mellitus (T2DM) unterschieden. Daneben existieren noch weitere spezifische Diabetestypen (Typ 3) und der Schwangerschaftsdiabetes (Typ 4) (Polonsky, 2012). Das wichtigste Merkmal des T1DM ist ein absoluter Insulinmangel, der durch eine meist autoimmun bedingte Betazellzerstörung entsteht (Guthrie et al., 2004). Der weitaus häufigere T2DM beruht hingegen auf einer gestörten Wirkung des Insulins (sogenannte Insulinresistenz) an den Zielzellen, die durch eine Gewöhnung an dauerhaft erhöhte Blutglukoselevel entsteht. Die Insulinresistenz entsteht als Folge einer zunächst kompensatorisch erhöhten Insulinsekretion (Goldstein, 2002). Bei der Pathogenese des T2DM spielt die Interaktion zwischen genetischen, umwelt- und verhaltensbedingten Risikofaktoren eine wichtige Rolle (Kahn et al., 2014).

Eine schwere Hyperglykämie die mit Störungen der Insulinproduktion und -wirkung einhergeht, führt von klassischen Symptomen wie Polyurie (Harnflut), Polydipsie (Vieldurstigkeit), Müdigkeit, Leistungsabfall und Sehstörungen zu weitreichenden Stoffwechselstörungen und vielen weiteren Begleitscheinungen. Grundsätzlich sind die meisten Symptome bei beiden Diabetestypen ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Ausprägungsgrad und entwickeln sich bei T1DM schneller und typischer (Roden et al., 2016).

Es gibt verschiedene Ansätze zur Diagnostizierung bei Betroffenen. Wichtig dafür sind die Bestimmung der Nüchternglukose und des Hämoglobin A1c (HbA1c), sowie die Durchführung eines oralen Glukosetoleranztest (OGTT) (American Diabetes Association, 2010). Das Ziel der Therapie ist die Normalisierung des Glukosestoffwechsels und die Vorbeugung beziehungsweise Behandlung der Früh- und Spätschäden.

1.1.2 Einfluss des Diabetes Mellitus auf die Skelett- und Herzmuskulatur

Während sich der T1DM und T2DM in ihrer Pathogenese stark unterscheiden, überschneiden sich die daraus resultierenden Pathologien häufig. Diabetes führt nicht nur zu einer Dysregulation des Glukosestoffwechsels, sondern entwickelt sich langfristig zu einer chronischen Entzündungskrankheit die insbesondere Störungen im Muskelproteinstoffwechsel verursacht (Workeneh and Bajaj, 2013). Es entsteht ein kataboler Muskelstoffwechsel aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen der herabgesetzten Proteinsynthese und der beschleunigten Proteindegradation (Sandri, 2010; Wolfe, 2005). Als Folge leiden die Patienten unter dem Krankheitsbild der diabetischen Myopathie, die durch Kraftminderung und Muskelatrophie gekennzeichnet ist und mit starken Einbußen in der Lebensqualität und Aktivität einhergeht (D'Souza et al., 2013). Die diabetische Myopathie ist eine noch unzureichend untersuchte Komplikation des Diabetes Mellitus. Es wird jedoch angenommen, dass sie die Geschwindigkeit der Komorbiditätsentwicklung direkt beeinflusst (D'Souza et al., 2013).

Die Hyperglykämie ist ebenfalls ein Risikofaktor für chronische Herzscheiden. In vorangegangenen Studien wurde auf eine veränderte Protein-Qualitäts-Kontrolle in Herzen von diabetischen Tieren hingewiesen (Queisser et al., 2010). Insbesondere die krankheitsbedingte Hemmung der Autophagie in diabetischen Herzmuskelzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der diabetischen Kardiomyopathie (Ouyang et al., 2014).

Insulin ist das zentrale Hormon für die Senkung des Blutzuckers. Zusätzlich zu seinen Auswirkungen auf die intrazelluläre Glukoseverarbeitung hat Insulin eine vielseitige Wirkung auf die Organe im Körper. In der Muskulatur führt es zu einer Hemmung des Proteinabbaus und gleichzeitiger Stimulierung der Proteinsynthese, sowie zu einer Steigerung der Aminosäureaufnahme (Biolo et al., 1995). Außerdem fungiert die Skelettmuskulatur als Ort der höchsten Glukoseaufnahme (DeFronzo et al., 1981). Da Typ-1 und Typ-2 Diabetiker über eine unterschiedlich hohe Insulinproduktion und –wirkung verfügen, sind vermutlich auch die Auswirkungen auf den Proteinstoffwechsel unterschiedlich stark ausgeprägt. Auch klinisch stellt sich ein Unterschied dar. T1DM Patienten sind zum Diagnosezeitpunkt mit geringerer Wahrscheinlichkeit übergewichtig als Typ-2 Patienten und weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten eine verminderte Muskel- und Fettmasse auf (Rosenfalck et al., 2002). Als Grund dafür wird postuliert, dass die Muskulatur eines Patienten mit dem oft angeborenen Typ-1 Diabetes

über eine längere Zeit atrophischen Stimuli ausgesetzt ist und daher irreversible Veränderungen erleidet (D'Souza et al., 2013).

Abseits der Störungen im Muskelproteinstoffwechsel führt eine dauerhafte Hyperglykämie intrazellulär zu einer verminderten Antioxidationsfähigkeit und nachfolgend zu einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Es wird angenommen, dass dies mit einer Verstärkung der Insulinresistenz einher geht (Gonzalez et al., 2011).

Zusammenfassend sind die Auswirkungen des Diabetes auf die Skelett- und Herzmuskulatur vielfältig. Störungen im Proteinstoffwechsel und der Protein-Qualitäts-Kontrolle nehmen eine zentrale Rolle ein und können gleichzeitig als Ursache und Folge der Krankheit betrachtet werden.

1.2 Die Protein-Qualitäts-Kontrolle innerhalb der Skelettmuskelzelle

Die Muskulatur im menschlichen Körper macht ca. 40-50% des Körpers aus und hat einen wichtigen Einfluss auf die Kontrolle des Stoffwechsels. Unter katabolen Bedingungen werden Muskelproteine mobilisiert, um alternative Energiesubstrate bereit zu stellen (Sandri, 2010). Dieser ständige Ab- und Umbau innerhalb von Skelettmuskelzellen erfordert eine koordinierte Protein-Qualitäts-Kontrolle. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und das Autophagolysosomale-System (ALS) gehören zu den wichtigsten proteolytischen Stoffwechselwegen und werden nachfolgend erklärt.

1.2.1 Das Autophagolysosomale-System (ALS)

Autophagie bedeutet aus dem griechischen übersetzt „Selbstverdauung“ und beschreibt damit einen intrazellulären katabolen Prozess. In den meisten Zellen findet konstitutiv eine Basalrate der Autophagie statt um eine zelluläre Homöostase zu gewährleisten (Levine et al., 2008). Insgesamt werden drei Formen unterschieden: Die Chaperon vermittelte Autophagie, die Mikroautophagie und die Makroautophagie. (Sandri, 2013). Diese Übersicht konzentriert sich auf die biochemischen Signalwege der Makroautophagie, welche fortan als Autophagie bezeichnet wird.

1.2.1.1 Ablauf der Autophagie

Verschiedene Einflüsse wie beispielsweise Nährstoffmangel, metabolischer Stress, Sauerstoffmangel oder eine Akkumulation von Proteinaggregaten führen adaptiv zu einer Hochregulation der Protein- und Organelldegradation und Recycling, sodass eine Deckung des Energiebedarfs gewährleistet wird (Levine et al., 2008).

Die Autophagie ist ein zellulärer Prozess, bei dem der zytoplasmatische Inhalt innerhalb eines (Auto-)Lysosoms abgebaut wird und die resultierenden makromolekularen Bestandteile recycelt werden (Feng et al., 2014). Hierbei handelt es sich vor allem um beschädigte Organellen, fehlgefaltete Proteine und invasive Mikroben.

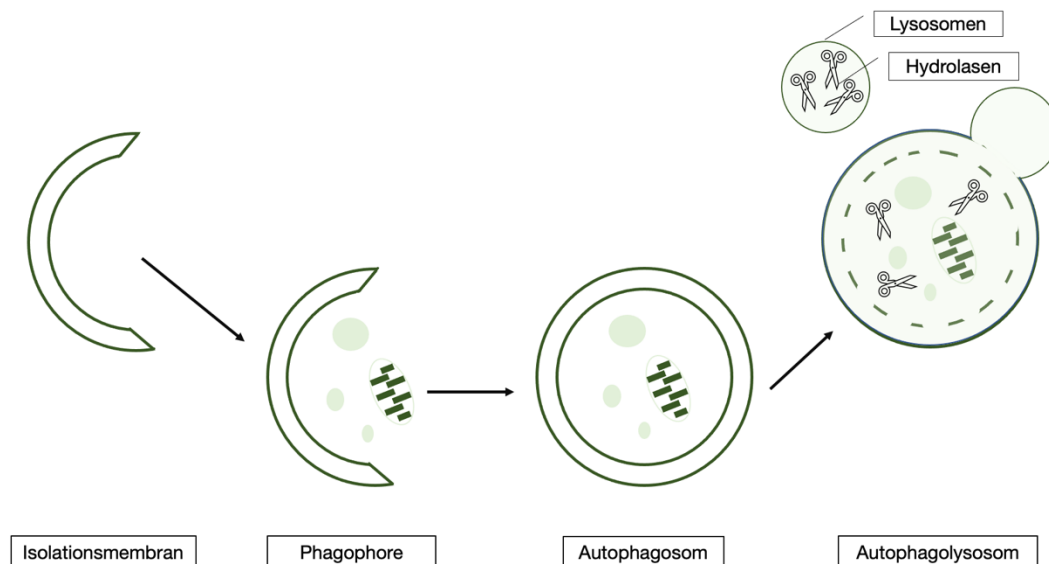


Abbildung 1 Schema der Autophagosomen Bildung.

Eine Isolationsmembran entwickelt sich durch Verlängerung der Doppellipidmembran zur Phagophore und schließlich zum Autophagosom. Nach der Verschmelzung mit dem Lysosom kommt es zur Zersetzung des Inhalts durch Hydrolasen.

Im ersten Schritt zur Bildung des Autophagosoms wird die *Phagophore* gebildet (Abb. 1), eine Doppelmembranstruktur die vom Endoplasmatischen Retikulum stammt (Lamb et al., 2013). Diese verlängert sich durch die koordinative Wirkung von Autophagie-bezogenen Proteinen (ATG's), woraus ein Autophagosom entsteht (Feng et al., 2014; Lamb et al., 2013). Dieses verschmilzt anschließend mit einem Lysosom und wird ab diesem Zeitpunkt als Autophagolysosom bezeichnet. Das sequestrierte zytoplasmatische Material wird durch lysosomale Proteasen zu Aminosäuren und Makromolekülen abgebaut. Nach dem Transport über die lysosomale Membran zum

Zytosol werden sie dann beispielsweise zur Herstellung neuer Proteine wiederverwendet (Hale et al., 2013; Shibutani et al., 2014).

Die Autophagie unterliegt einer hoch komplexen Regulation (Abb. 2) mit einer Vielzahl an beteiligten Proteinen und Enzymen (ATG's). Eine wichtige Rolle nehmen dabei die sogenannte Schlüsselregulatoren ein, die das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Autophagie als Reaktion auf zellphysiologische Bedingungen regulieren (Jung et al., 2010). Hierzu gehören die Serin/Theronin Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und die AMP-aktivierte Proteinkinase alpha, kurz AMPK α (Jung et al., 2010; Levine et al., 2008). Ein Substrat von mTOR und AMPK α ist die ULK1 (*Unc-51 like autophagy activating kinase*), die zusammen mit ATG13, FIP200 und ATG101 den sogenannten ULK1-Komplex bildet. Die Hemmung der Autophagie erfolgt unter nährstoffreichen Bedingungen und wird erzielt durch die verstärkte Phosphorylierung der ULK durch mTOR (Bento et al., 2016; Chan, 2012). Bei unzureichender Nährstoffversorgung führt die Phosphorylierung der ULK durch die AMPK α zur Verstärkung der Autophagie (Egan et al., 2011).

Bei aktiver Autophagie phosphoryliert der ULK-Komplex Beclin 1, welches ein Bestandteil des nachgeschalteten III PI3K-Komplex ist. Dieser enthält neben Beclin 1 auch die ATG14, VPS15 und VPS34 (Bento et al., 2016; Chan, 2012). VSP34 ist eine *Klasse III – PI3K Kinase* die für die Produktion von *Phosphatidylinositol-3- Phosphat (PI3P)* verantwortlich ist (Bento et al., 2016; Chan, 2012; Russell et al., 2013). Die Akkumulation von PI3P ist notwendig für Rekrutierung von Proteinen und Lipiden, die in die Phagohore eingebaut werden und eine Formation zum Autophagosom zulassen (Bento et al., 2016; Shibutani et al., 2014). Eines der rekrutierten Proteine ist LC3, welches als aktive Form (LC3-II) die autophagosomale Membran von innen und außen besetzt (Hale et al., 2013).

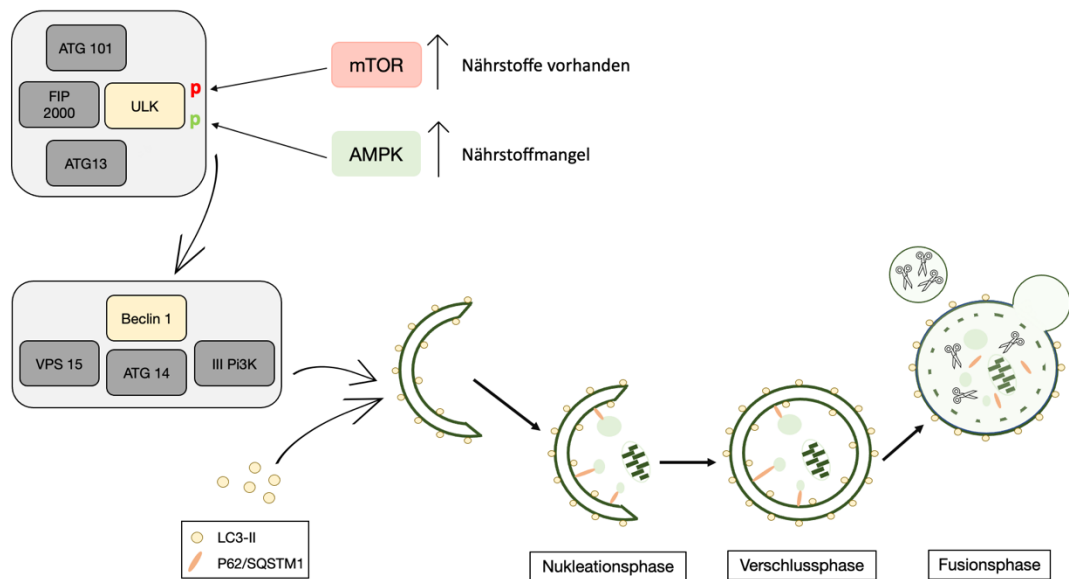


Abbildung 2 Regulation der Autophagosom Bildung.

Die Regulationskinasen mTOR und AMPK α bewirken durch eine Phosphorylierung der ULK eine Induktion bzw. eine Inhibition des Autophagie-Prozesses. Bei aktiver Autophagie erfolgt eine Aktivierung von Beclin-1, ein Bestandteil des Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase-Komplexes (III PI3K). Es folgt die Rekrutierung von Doppellipidmembran-Bestandteilen wie p62/SQSTM1 und LC3-II zur Formation des Autophagosoms.

LC3-II entsteht bei aktiver Autophagie aus LC3-I (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) durch proteolytische Spaltung und Lipidierung mit Phosphatidylethanolamin (Hale et al., 2013). Das mit der Außenmembran assoziierte LC3-II wird recycelt, während das im Autophagolysosom befindliche LC3-II durch Proteasen abgebaut wird (Hale et al., 2013; Shibutani and Yoshimori, 2014).

Um eine selektive Autophagie zu ermöglichen, werden abzubauen Proteine ubiquitiniert und beispielweise über das Bindeprotein p62/Sequestosom-1 (p62/SQSTM1) an LC3-II und damit an die Innenseite der Doppelmembran gebunden (Lamark et al., 2017).

1.2.1.2 Selektive Proteindegradation über die Ubiquitinierung

Abzubauen Proteine werden zunächst mittels Ubiquitin markiert, einem Polypeptid mit 76 Aminosäureresten und einem Molekulargewicht von 8,5 kDa (Hershko et al., 1998). Diese Markierung erfolgt an bestimmten Lysinresten, was als Signal für die weitere Verarbeitung dient. Ubiquitinmoleküle können sich auch untereinander

verbinden und eine sogenannte Polyubiquitininkette bilden (Finley, 2009; Ji et al., 2017). Werden die Ubiquitinmoleküle untereinander über den Lysinrest 48 verknüpft, wird das Substrat an das Proteasom weitergeleitet (Thrower, 2000). Eine Markierung über Lysinrest 63 markiert Substrate üblicherweise für den autophagolysosomalen Abbau (Nandi et al., 2006).

Über das Ubiquitin Ligase System erfolgt in drei Teilschritten die Ubiquitinierung des Zielsubstrates. Zunächst wird Ubiquitin über das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) ATP abhängig aktiviert. Das Ubiquitin-Trägerprotein (E2) überträgt das aktivierte Ubiquitin nun auf das Zielprotein. Über das dritte Enzym (E3) wird schließlich die Isopeptidbindungen zwischen Ubiquitin und dem Substrat katalysiert (Ciechanover et al., 1989; Finley, 2009). Durch diesen dreistufigen Prozess werden alle bekannten Ubiquitinierungsreaktionen initiiert, unabhängig vom nachfolgenden Zielort des ubiquitinierten Substrats (Pickart, 2001).

1.2.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Ein Großteil des zytosolischen Proteinabbaus in Eukaryoten erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Nandi et al., 2006). Hierunter fällt das 26S- Proteasom, das die meisten intrazellulären Proteine endoproteolytisch aufspaltet, wodurch die biologische Homöostase aufrechterhalten und viele wichtige zelluläre Prozesse reguliert werden (Gallastegui et al., 2010).

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) spielt eine wichtige Rolle bei der raschen Entfernung und Qualitätskontrolle von fehlgefalteten oder veralteten Proteinen, der Regulation der Gentranskription, der Unterstützung des Immunsystems durch selektive Antigenpräsentation und bei der Bereitstellung von Aminosäuren (Finley, 2009; Lecker et al., 2006).

1.2.2.1 Aufbau des Proteasoms

Der multikatalytische Komplex wird in zwei Hauptbestandteile unterteilt: den 20S-Proteasom Kernpartikel (CP) in dem die Substratproteolyse stattfindet und den 19S-Regulatorpartikel-Komplex (RP), der K48-ubiquitinierte Substrate erkennt und entfaltet (Gallastegui et al., 2010). Ein aktives Proteasom entsteht aus dem Zusammenschluss der beiden Untereinheiten (Hoffmann et al., 1992). Der Kernpartikel (CP) besteht genau betrachtet aus vier heptamerisch gestapelten Ringen ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$). Die beiden äußeren

Ringe bestehen aus Untereinheiten vom α -Typ, die inneren beiden Ringen aus Untereinheiten vom β -Typ (Nandi et al., 2006). Drei dieser β -Untereinheiten stellen proteolytisch aktive Zentren dar, die als *Caspase-like* ($\beta 1$), *Trypsin-like* ($\beta 2$) und *Chymotrypsin-like* ($\beta 5$) Enzymaktivitäten bezeichnet werden. Die Aufgabe der α -Ringe ist die Substratkontrolle beim Eintritt in das katalytische Zentrum (Groll et al., 2005). Bevor es zur Weiterleitung des Substrates in den proteolytischen Kern kommt, erfolgt zunächst eine Deubiquitinierung (Nandi et al., 2006). In Abb. 3 ist der Aufbau eines Proteasoms schematisch dargestellt.

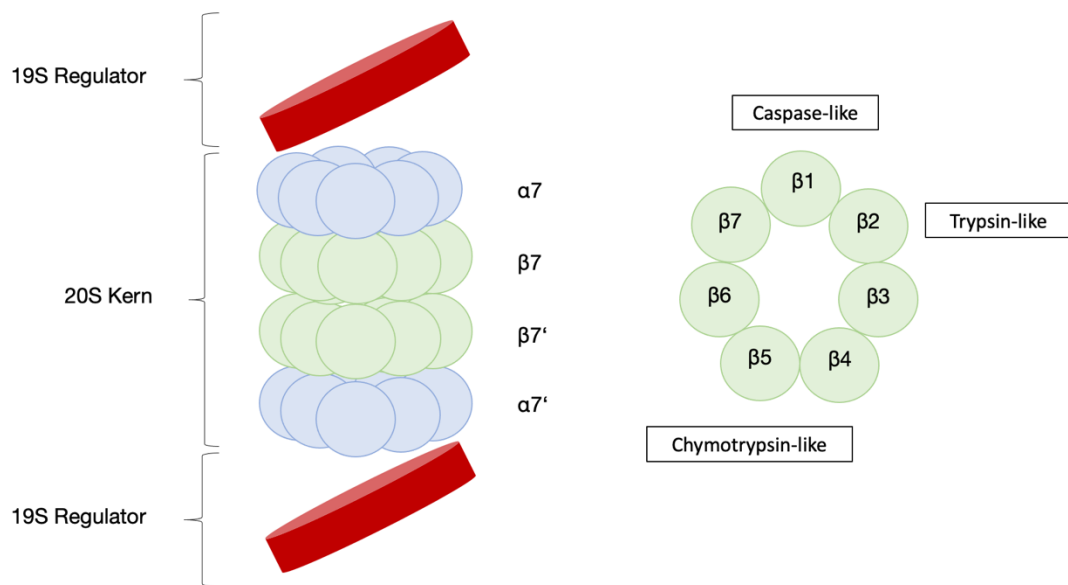


Abbildung 3 Aufbau des 26S Proteasoms.

Das Proteasom besteht aus zwei regulatorischen 19S und einer zentralen katalytischen 20S Untereinheit. Die katalytische Untereinheit besitzt drei proteolytische Aktivitäten in ihren heptameren β -Einheiten: *Trypsin-like*, *Chymotrypsin-like* und *Caspase-like* Enzymaktivität.

1.2.3 Der Crosstalk zwischen ALS und UPS

Ursprünglich wurden das Ubiquitin-Proteasom-System und das Autophagolysosomale-System als zwei voneinander vollständig unabhängige degradierende Systeme angesehen. Neuere Erkenntnisse legen jedoch nahe, dass es eine Art Crosstalk zwischen dem UPS und dem ALS gibt aufgrund dessen die Induktion oder Hemmung eines der Systeme die Aktivität des anderen Systems nachweislich verändert (Ji et al., 2017). In Studien wurde darüber berichtet, dass es zu einer Aktivierung der Autophagie kommt, wenn ubiquitinierte Proteine vom Proteasom nicht in ausreichendem Maße verarbeitet werden können (Bao et al., 2017). Die Hemmung des UPS führt also zu einer kompensatorischen Aktivierung der Autophagie (Ji et al., 2017).

Andersherum herum führt jedoch eine autophagische Hemmung zu einer Beeinträchtigung des proteasomalen Flusses (Matsumoto et al., 2011; Munch et al., 2014). Fehlgefaltete p62-assoziierte Proteine akkumulieren und werden stark verzögert an die Proteasen des Proteasoms übermittelt (Korolchuk et al., 2009).

Ein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen den beiden proteolytischen Systemen ist wichtig um die physiologischen Stoffwechselvorgänge aufrecht zu erhalten. Der Crosstalk zwischen Autophagie und UPS kann jedoch unter Krankheitsbedingungen seinen Charakter verändern, zur Pathogenese von Krankheiten beitragen und sogar deren Ausgang beeinflussen (Kocaturk et al., 2018).

1.3 Das Sarkomer

1.3.1 Die Myofilamente

Die Skelettmuskulatur stellt im Körper den größten Teil der Muskulatur dar. Ein Muskel setzt sich aus Muskelfasern zusammen, die aus hunderten Myofibrillen bestehen. Diese bestehen wiederum aus Sarkomeren, den kleinsten kontraktilen Einheiten eines Muskels (Tskhovrebova et al., 2003). Sie ermöglichen durch eine koordinierte und gezielte Längenvariation die Kontraktionsfähigkeit des Muskels. An der Längenvariation sind drei Myofilamente beteiligt: die dicken Myosinfilamente, die dünnen Aktinfilamente und die elastischen Titinfilamente. Die geordnete und hierarchische Anordnung der Myosin- und Aktinfilamente verleihen dem Muskel seine im Lichtmikroskop sichtbare charakteristische Querstreifung. Die geordnete Assemblierung von Protein-Untereinheiten zu regelmäßigen Sarkomeren wird durch das Riesenprotein Titin ermöglicht (Lange et al., 2006).

1.3.2 Der schematische Aufbau des Sarkomers

Ein Sarkomer erstreckt sich auf den Bereich zwischen zwei Z-Scheiben, die den Aktinfilamenten als Ansatz dienen (Pyle et al., 2004). Außerdem durchspannt Titin ausgehend von der M-Linie das Sarkomer und verbindet auf diesem Wege die Myosinfilamente mit der Z Scheibe. Am Ende einer Kontraktion sorgen die Rückstellkräfte des Titins dafür, dass die Myosinfilamente wieder in ihre Ausgangsposition zurück geführt werden. Dadurch hat Titin einen großen Einfluss auf die aktive Kraftentwicklung (Agarkova et al., 2005; Fürst et al., 1988; Horowitz et al., 1989). Der schematische Aufbau eines Sarkomers ist in Abb. 4 dargestellt.

Eine Z-Scheibe liegt zentriert innerhalb einer I-Bande, dem hellsten Bereich im Sarkomer, der nur von Aktinfilamenten eingenommen wird. Diese wird aufgrund ihrer gleichmäßig reflektierenden lichtbrechenden Eigenschaften als isotrop bezeichnet. Je nach Dehnungs- beziehungsweise Kontraktionsstatus, verbreitert oder verschmälert sich die I-Bande. Die A-Bande (anisotrop) hingegen umfasst als dunkelster Bereich die gesamte Länge der Myosinfilamente. Die zentrale Region der A-Bande ist ausschließlich Myosinhaltig und erscheint dadurch heller. Sie wird als H-Zone bezeichnet. Die M-Linie besteht wiederum aus der Quervernetzung der Myosinfilamente untereinander (Agarkova et al., 2005; Knappeis et al., 1968).

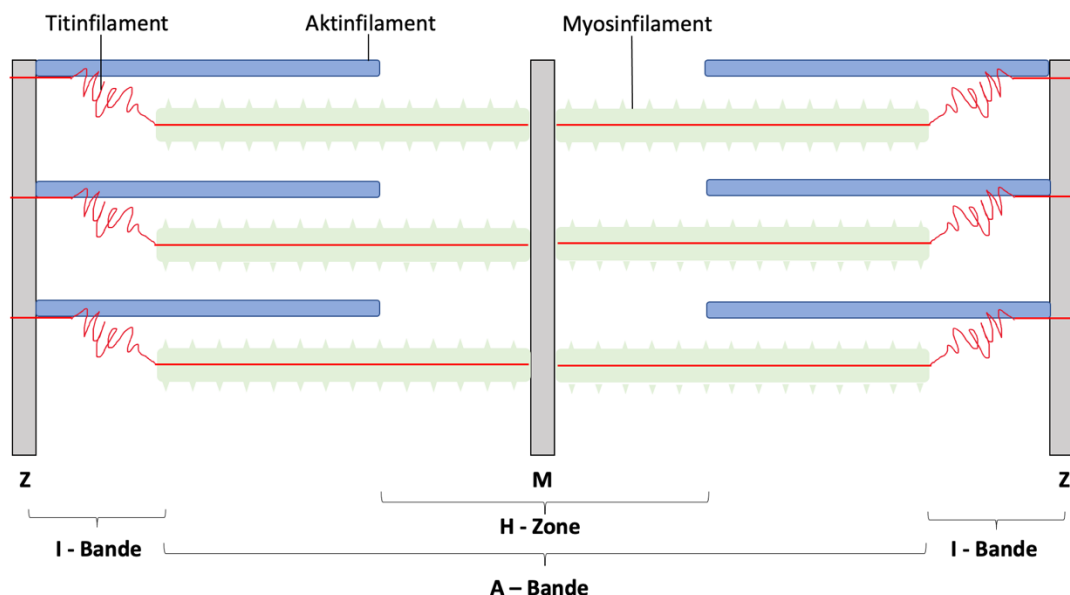


Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Sarkomers.

Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit eines Muskels. Die wichtigsten Strukturproteine sind Aktin, Myosin und Titin. Ein einzelnes Titinfilament durchspannt das Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Innerhalb eines Sarkomers unterscheiden sich verschiedene Bereiche. Durch das Ineinandergleiten bewirken die Myosin- und Aktinfilamente eine Verkürzung des Sarkomers.

Eine Muskelkontraktion resultiert aus einer Verkürzung des Sarkomers, welche jedoch nicht auf einer Verkürzung der Filamente basiert, sondern auf dem Ineinandergleiten der Filamente beruht. Dieser Mechanismus wird auch als Gleitfilamenttheorie bezeichnet (Huxley et al., 1954). Die treibende Kraft für die Filament-Bewegung resultiert aus einer ATP – abhängigen Konfigurationsänderung der Myosinköpfchen, durch die die Aktinfilamente in Richtung M- Linie verschoben werden. Die Lösung des Myosinköpfchens von Aktin verlangt Energie in Form von ATP (Maruyama, 1994).

1.4 Titin

1.4.1 Molekularer Aufbau

Der strukturelle Aufbau von Titin ist hauptsächlich durch die sequentielle Anordnung von immunglobulinähnlichen Domänen (Ig- Domänen), Fibronectin-Typ-3-Domänen und mehreren sogenannten einzigartigen Sequenzen (*unique sequences*) gekennzeichnet (Bang et al., 2001). Das Molekül kann auf vier verschiedene Bereiche im Sarkomer - die M-Linie, die A-Bande, die I-Bande und die Z-Linie – aufgeteilt werden.

Auf molekularer Ebene setzt sich die I-Band-Region aus insgesamt drei Haupt-Molekularsegmenten zusammen. Das Ig-Segment besteht aus einer variablen Anzahl von Ig-Domänen und teilt sich in einen proximalen, mittleren und distalen Anteil auf. An den proximalen Teil schließt sich die N2-B Region an, die aus alternierenden Ig-Domänen und *unique sequences* besteht. Anschließend folgt die PEVK Domäne, die aufgrund ihrer überwiegenden Anzahl von Prolin- (P), Glutamat- (E), Valin- (V) und Lysin- (K) Resten benannt wird. Dieser I-Band-Teil kann während der Sarkomerdehnung sequentiell gedehnt werden und stellt das elastische Hauptsegment des Titins dar. Titin wird daher auch als elastische Molekularfeder bezeichnet (Li et al., 2002; Linke et al., 1999, 1996; Trombitás et al., 1998).

Die Z-Linien- und M-Linien-Teile des Titins enthalten Ig-Domänen, die mit *unique sequences* unterschiedlicher Größe durchsetzt sind (Bang et al., 2001). Mit einer Größe von etwa 2 MDa stellt der A-Banden-Anteil des Titins den größten Teil des Moleküls dar (Bang et al., 2001) und er ist eng mit Myosin und dem myosinbindenden Protein C assoziiert (Lange et al., 2006; Tskhovrebova et al., 2004).

1.4.2 Expression der Isoformen

Die muskeltypspezifische Expression von PEVK-Domänen variabler Länge und proximalen Ig-Regionen führt zu verschiedenen Titin-Isoformen die alternativ von einem einzigen Gen gespleißt werden (Chromosomenort beim Menschen, 2q31) (Freiburg et al., 2000; Labeit et al., 1995). Das alternative Splicing findet hauptsächlich im I-Band statt (Freiburg et al., 2000). Die große Vielfalt bezüglich der Zusammensetzung der Titin-Domäne im Federsegment ist der Grund für die große Variabilität der titinbasierten Steifigkeit zwischen verschiedenen Skelettmuskeln (Linke et al., 2010). Die derzeit bekannten Isoformen unterscheiden sich in der Größe von ~600 kDa bis 3,7 MDa, was Moleküllängen von etwa 0,2-1,4 µm entspricht (Tskhovrebova et al., 2003).

Es gibt zwei alternative Formen der N2-Region - N2A und N2B (Abb. 5). Skelettmuskelsarkomere exprimieren sogenannte N2A-Titin-Isoformen (3.3-3.7 MDa) mit vielen muskelspezifischen Spleissvarianten (Freiburg et al., 2000; Neagoe et al., 2003; Prado et al., 2005). Im Herzmuskel wird Titin in zwei Hauptisoformen ausgedrückt: die N2B-Isoform (3.000 kDa), die ein kürzeres, steiferes Federsegment aufweist, und (variable) N2BA-Isoformen (3.200 - 3.700 kDa), die längere Federn enthalten und daher nachgiebiger sind (Linke et al., 2010). Während der kardialen Entwicklung exprimiert das Herz zunächst die elastische fetale N2BA-Isoform aus, die nach der Geburt durch die kleinere N2BA- und die N2B-Isoform ersetzt wird (Opitz et al., 2004).

Abbildung 5 Darstellung unterschiedlicher Titin Isoformen im Halbsarkomer.

1.4.3 Sarkomerische Funktion

Rückstoß der Myozyten (Linke and Krüger, 2010). Außerdem stabilisiert Titin die Verbindung von Myosin- mit Aktinfilamenten und zentralisiert sie im Sarkomer während der Kontraktions- und Extensionszyklen (Maruyama, 1994). So entsteht ein Kräfteausgleich zwischen den beiden Sarkomerhälften und eine optimale Kraftentwicklung ist möglich. (Horowitz et al., 1986; Linke et al., 2010).

Abgesehen davon spielt Titin eine wichtige Rolle als Mediator der myozytären Signaltransduktion, da es an verschiedene Proteine bindet, die bei der Assemblierung und dem Umsatz von Sarkomeren eine wichtige Rolle spielen (Krüger et al., 2011). Die direkte Wechselwirkung von Titin mit zahlreichen sarkomeren Proteinen ist besonders relevant im Hinblick auf seine Rolle als molekulare Vorlage bei der Assemblierung der Myofibrillen (Gregorio et al., 1998). Titin ist hauptsächlich in die Qualitätskontrolle von Proteinen, die hypertrophe Genaktivierung und das Mechanosensing eingebunden (Linke et al., 2010). Die N2A Region ist beispielsweise über Bindungspartner an Hypertrophie-Signalwege und die Protein-Qualitäts-Kontrolle gekoppelt (Hayashi et al., 2008; Miller et al., 2003).

Titin ist das Substrat zahlreicher Proteinkinasen. Durch posttranslationale Modifikation wird die Titinsteifigkeit und die passive mechanische Eigenschaft des Sarkomers dynamisch moduliert, was eine Relevanz in zahlreichen muskelspezifischen Erkrankungen mit sich bringt (Krüger, 2015). Bisher wurden Phosphorylierungsstellen in den Titin-Anteilen der Z-Scheibe, der I-Bande und der M-Bande beschrieben. Die meisten der bisher beschriebenen Phosphorylierungen ereignen sich in der I-Banden Region und finden dort vor allem am N2B(us) und PEVK Segment statt. Im Bereich der I-Bande beeinflusst eine Phosphorylierung in der Regel beispielsweise die passiven mechanischen Eigenschaften des Sarkomers. Die Proteinkinasen A und G phosphorylieren Titin am N2-B Segment und senken die passive Steifigkeit (Kötter et al., 2013; Krüger et al., 2009). Das PEVK Segment wird ferner durch die Proteinkinase-C α und die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CAMKII δ) phosphoryliert wodurch eine Erhöhung der passiven Spannung von Kardiomyozyten vermittelt wird (Hamdani et al., 2013).

1.4.4 Titin und die sarkomerische Protein-Qualitäts-Kontrolle

Die Ab- und Umbauprozesse von Titin sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund der Größe von Titin wird angenommen, dass eine Art Vorverdau durch Proteasen wie Calpain und Matrixmetalloproteinasen stattfindet, um das Protein aus

dem Sarkomerverbund zu lösen und es damit zugänglicher für die Bestandteile des Proteasoms bzw. der Autophagie zu machen. Dafür wird Titin zunächst über die E3-abhängige Ubiquitin-Ligase polyubiquitiniert (Linke et al., 2010; Witt et al., 2005).

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass in der Zellkultur eine Hemmung des Proteasoms zu einer Akkumulation des K48-polyubiquitinierten Titins führte (Kötter et al., 2016). Dies legt einen Zusammenhang zwischen Titin und der proteasomalen Degradation nahe. Neuere Studien ergaben, dass die Verbindung durch die Interaktion der Ubiquitin-Ligase Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*) mit Telethonin (*Titin cap protein*) ermöglicht wird (Tian et al., 2006). Außerdem gibt es Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Titin und dem autophagolysosomalen Abbau (Lange, 2005).

Die Degradation von Titin wird auch als Titin Turnover bezeichnet und besitzt ein spezifisches Zwischenprodukt, welches als Degradationsbande (T2) bezeichnet wird. Die T2 Bande entsteht wahrscheinlich durch die Proteolyse vom full-length Titin nahe der PEVK-Region was zu einem großen Titin (T2)-Fragment führt, das die A-Bande und distale Ig-Segmente des Titins enthält (Trombitás et al., 1998).

1.5 Vergleich der Muskeln

In der vorliegenden Studie wurden die Untersuchungen am Gewebe des M. Quadriceps und des M. Psoas durchgeführt. Grundsätzlich besteht ein Skelettmuskel aus verschiedenen Fasertypen, die sich durch ihre spezifischen Myosin-Schwerketten-Isoformen (MHC) unterscheiden (Schiaffino et al., 1994). In Skelettmuskeln von Säugetieren werden 9 MHC Isoformen exprimiert (Arbanas et al., 2009), während in menschlichen Muskeln drei Formen unterschieden werden (Typ I, IIA und IIX.) (Staron et al., 1997). Typ I Fasern zeichnen sich durch eine langsame (slow twitch) Kontraktionsgeschwindigkeit aus und verfügen über einen oxidativen Stoffwechsel. Typ II Fasern (fast twitch) kontrahieren schnell und beziehen ihre Energie vorzugsweise aus Glykogen (Andersen et al., 1997).

Typ I Fasern sind überwiegend in tonischen Muskeln vertreten und übernehmen oft eine posturale Rolle (Boyd-Clark et al., 2001; Mannion et al., 1997). Im Gegensatz dazu überwiegen die Fasern vom Typ II in den Muskeln, deren primäre Funktion darin besteht, schnelle Bewegungen auszuführen (Srinivasan et al., 2007; Terzis et al., 2003).

Bei Menschen und Säugetieren bildet der Psoas Muskel zusammen mit dem M. Iliacus den M. Iliopsoas und gehört zur inneren Hüftmuskulatur (Penning, 2000). Er entspringt

an der unteren Wirbelsäule und setzt am Oberschenkel an. Dadurch ermöglicht er eine Seitwärtsneigung der Wirbelsäule und eine Beugung und Außenrotation im Hüftgelenk. Er verfügt somit über wichtige dynamische und posturale Funktionen (Williams et al., 2005) und wird als aktiver Haltemuskel angesehen (Penning, 2000; Yoshio et al., 2002). Im Gegensatz zum Menschen ist die Ratte ein Vierfüßler und steht nur gelegentlich auf den Hinterbeinen. Daher muss die Fasertyp Zusammensetzung des Iliopsoas Muskels bei der Ratte nicht unbedingt mit der des Menschen übereinstimmen (Vlahovic et al., 2017).

Der vierköpfige M. Quadriceps (bestehend aus Vastus lateralis, Vastus medialis, Vastus intermedius und Rectus femoris) spielt bei der Ratte eine wichtige Rolle für das Sprint- und Ausdauerverhalten (Kohn et al., 2007). Beim Menschen ist der Muskel zum Beispiel für das Aufrichten aus der Hocke in den Stand unabdingbar.

1.6 Zielsetzung

Ein klinisches Hauptsymptom von Diabetikern ist die Muskelatrophie- und schwäche, die einen massiven Funktionsverlust zur Folge haben kann. Da Diabetes mit gravierenden Störungen im Muskelproteinstoffwechsel einhergeht liegt der Verdacht nahe, dass im Rahmen dieser Störungen auch Mechanismen der Protein-Qualitäts-Kontrolle verändert sind.

Ziel dieser Arbeit ist, die Veränderungen der Protein-Qualitäts-kontrolle in Skelettmuskelzellen sowie den Abbauweg und Umsatz des sarkomerischen Proteins Titin zu analysieren. Hierfür sollte mittels SDS-Gelelektrophorese das Gewebe vom Psoas- und Quadricepsmuskel von Typ-1 diabetischen (STZ Modell) und Typ-2 diabetischen (ZSF1 Modell) Rattenmodellen analysiert werden. Die hierfür verwendeten Muskeln unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktion und Faserzusammensetzung, was einen wichtigen Einfluss auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle haben kann.

Im ersten Teil der Arbeit sollte zunächst mittels Westernblot Analysen ein potentieller Einfluss des Diabetes auf die Autophagieaktivität anhand der Autophagiemarker AMPK α , mTOR, PSMA2, LC3-I, LC3-II und p62 erfolgen. Um mögliche Kompensationsversuche einer veränderten Autophagieaktivität zu analysieren, sollte die Proteasomaktivität durch ein Proteasomassay untersucht werden. Hierfür wurden Analysen der Chymotrypsin-like und Trypsin-like Aktivitäten erstellt.

Das Strukturprotein Titin ist maßgeblich an der Assemblierung von Sarkomeren beteiligt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es aufgrund seiner Größe für die Degradation sehr anfällig ist und eine diabetische Stoffwechsellage einen gravierenden Einfluss auf die Halbwertszeit des sarkomerischen Proteins Titin haben könnte. Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob es damit verbunden zu einer veränderten K63- und K48 abhängigen Titinpolyubiquitinierung kommen könnte und daraus folgend ein erhöhter Umsatz des Proteins zur Folge resultiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 1 genannten Chemikalien verwendet.

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid / Bisacrylamid	Roth
Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Bovine Serum Albumine (BSA)	Capricon
Chemieluminescent Western Blot Detection	Thermo Fischer
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detection reagent)	Cynagan
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Glucose	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Appli Chem
Imperial protein stain	Pierce
Isofluran	Piramal Healthcare

Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Methanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Salzsäure 32%	VWR
Serva Blue R	Serva Electrophoresis GmbH
Beta Mercaptoethanol	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Appli Chem
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth
Tween 20	Sigma

2.1.2 Puffer und Lösungen

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 2 genannten Puffer und Lösungen verwendet.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10 x SDS Laufpuffer	250mM Tris 2M Glycin 1% SDS
10 x TBST (pH 7,4)	0,2M Tris / HCL 1,5M NaCl 1% Tween - 20
4 x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5M Tris / HCL 0,4% SDS
4 x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5M Tris / HCL

	0,4% SDS
Anodenpuffer (pH 8,8)	300mM Tris /HCL
	100mM Tricine
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300mM Aminocaprinsäure
	300mM Tris / HCL
Blockierlösung	2% BSA in 1x-TBST
Phosphate buffered saline (PBS)	150mM Natriumchlorid
	2,5mM Kaliumchlorid
	1,5mM Kaliumdihydrogenphosphat
	3mM Natriumdihydrogenphosphat
Proteasom Puffer	50ml PBS
	2,5µl EDTA
PVDF destain	10% Essigsäure
	40% Ethanol
PVDF stain	0,075% Serva Blue
	Methanol
SDS Probenpuffer (pH 6,8)	8M Urea
	2M Thiourea
	3% Natriumdodecylsulfat (SDS)
	0,035% Serva Blue
	10% Glycerol
	0,05M Tris/HCL
Stripping Buffer	6M Guanidinhydrochlorid
	20mM Tris
	0,2% Nonident P40
	0,1M beta-Mercaptoethanol

2.1.3 Antikörper

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 3 und 4 genannten primären und sekundären Antikörper verwendet.

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller / Bestellnummer
α -Aktinin	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #3134
Akt (pan)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4691
AMPK α	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2532
GAPDH	1:5000	Maus	Sigma Aldrich, #G8795
K48 Polyubiquitin	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #8081
K63 Polyubiquitin	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #5621
LC3B	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2775
mTOR	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2972
PEVK total	1:30.000	Kaninchen	Eurogentec
Phospho-Akt (ser473)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #4060
Phospho-Akt (Thr308)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2965
Phospho-AMPK α (Thr172)	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #2531

Phospho-mTOR (Ser2448)	1:2000	Kaninchen	Cell Signaling, #2971
PSMA2	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling, #11864
SQSTM1/p62	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling, #5114

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller/ Bestellnummer
Anti-mouse IgG, horseradish- peroxidase-linked	1:10000	Pferd	Cell Signaling, #7076
Anti-rabbit IgG, horseradish- peroxidase-linked	1:10000	Ziege	Cell Signaling, #7074

2.1.4 Kits

Zur Durchführung der Experimente wurden das in Tabelle 5 genannte Kit verwendet.

Tabelle 5: Kits

Name	Hersteller
Proteasome-Glo™ 3 Substrate System	Promega

2.1.5 Laborgeräte

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 6 genannten Laborgeräte verwendet.

Tabelle 6: Laborgeräte

Laborgerät	Modell	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Eismaschine	ZBE 110-35	Ziegra
Elektrophorese Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese Kammer	Mini- PROTEAN	Biorad
Feinwaage	AE163	Mettler
Gefrierschrank	Typ311104	Liebherr
Geldokumentationsanlage	Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software #1708195	Biorad
Glomax Multi Detection System	#9311-011	Promega
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank +4°C	KT1730	Liebherr
Kühlschrank -80°C	#RLE40086V	Thermoscientific
Magnetrührer	Professional Serie	VWR
Magnetrührer	RCT basic	IKA
Mikrowelle	Micromat 135	AEG
Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack P25	Biometra

PC Rechner	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
pH Meter	MP220	Mettler Toledo
Reagentienschüttler (Vortexer)	444-1372	VWR
Rollenmischer	RM5-30V	CAT
Sicherheitswerkbank	SAFE 2020	Thermo Scientific
Spectrophotometer	3000	Pharmacia
Taumelrollmischer	RM5-30V	CAT
Thermomixer	#5437B 00331	Eppendorf
Trans Blot Turbo System	#690BR013313	Biorad
Ultraschallbad	UltraTurrax IKA	Sigma-Aldrich
Waage	Kern 572	Kern
Wasserbad	3042	Köttermann
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifuge

2.2 Methoden

2.2.1 Westernblotverfahren

2.2.1.1 *Verwendete Tiere*

Zum Vergleich der beiden Diabetes Formen wurden zwei verschiedene Ratten Modelle verwendet. STZ Ratten repräsentieren ein Typ-1 Diabetes Modell, welches durch die Zerstörung der Beta Langerhanszellen im Pankreas durch eine Streptozotozin Injektion entsteht. Es wurden jeweils gesunde Kontroll Ratten mit diabetischen Ratten verglichen. ZSF1 Ratten entwickeln einen T2DM durch eine missense Mutation im Leptin Rezeptor Gen und sind eine Kreuzung zwischen nicht-hypertensiven weiblichen diabetischen Ratten (ZDF = Zucker diabetic fatty rat (T2DM) und spontan hypertensiven und für Herzinsuffizienz anfälligen männlichen Ratten. Enalapril ist ein gängiges bei Herzinsuffizienz und Hypertonie eingesetztes Medikament und soll einen Vergleich zu Herzinsuffizienz therapierten ZSF1 Ratten ermöglichen. Insgesamt werden hierbei jeweils normalgewichtige (lean) Kontrolltiere, mit diabetischen Placebo-behandelten Ratten und diabetischen Enalapril-behandelten Ratten verglichen. Als Ursprungsgewebe wurden zwei verschiedene Muskelgruppen untersucht: Musculus Psoas und Musculus Quadriceps.

Die ZSF1-Gewebeproben wurden mit freundlicher Genehmigung unserer Kooperationspartner der Bayer Pharma AG, Wuppertal zur Verfügung gestellt. Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigungen: N0400a222 Einzelversuch 012, "Prüfung von Substanzen bzgl. ihrer Wirkung auf den Verlauf der Erkrankung in diabetischen Modellen mit Endorganschäden" und 400a147.

2.2.1.2 *Probenaufbereitung*

Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden in stecknadelkopf große Stücke zerkleinert und mit 80 – 120 µl des Titinprobenpuffers versetzt. Die Zusammensetzung des Puffers ist Tabelle 2 zu entnehmen. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis gelegt, anschließend im Wasserbad bei 98°C für drei Minuten erhitzt und für weitere drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt.

2.2.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde nach Herstellerangaben mit dem Bradford-Reagenz der Firma SIGMA durchgeführt. Die Messung der Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ wurde am Photometer durchgeführt. Als Standard wurde eine BSA Eichgrade herangezogen. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die gewünschte Proteinmenge auf die Polyacrylamidgele aufgetragen.

2.2.1.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Visualisierung von Proteinen verschiedener Molekulargrößen im Bereich 10 kDA bis 260 kDA gelang durch eine Auftrennung im elektrischen Feld mittels SDS Page (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis) in einer Gelmatrix. Es handelt sich hierbei um eine denaturierende Gelelektrophorese.

Durch Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) erhielten die Proteine eine gleichmäßig negative Ladung, sodass die Auftrennung im Gel nur von der Molekülmasse abhängig war. Die hergestellten Gele konnten so je nach Polyacrylamid-Konzentration im Sammelgel Proteine in verschiedenen Größenbereichen darstellen. Zur Auftrennung von Proteinen mit geringer Molekülmasse wurde ein diskontinuierliches Verfahren verwendet. Als Radikalbildner diente Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (Temed) wurde als Katalysator eingesetzt.

Das Gel bestand aus zwei Anteilen. Auf Basis von Acrylamid wurde zunächst das untere Trenngel gegossen. Es wurde gemäß Tabelle 7 hergestellt und hatte einen variierenden Acrylamidgehalt von 7,5%, 10% oder 12,5%. Das obere Sammelgel wurde ebenfalls gemäß Tabelle 7 hergestellt. Die Proteinauftrennung erfolgte in 1x Laufpuffer bei einer Stromstärke von 15 mA – 30 mA pro Gel.

Tabelle 7: Pipettierschema für zwei SDS-Standardgele

Lösung	7,5%	- 10%	- 12,5%	- 15%	- 4%	-
	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel	
30% Acrylamid	3,75 ml	5 ml	6,25 ml	7,5 ml	0,667 ml	
H ₂ O bidest	7,5 ml	6,25 ml	5 ml	3,75 ml	3,025 ml	

4 x SDS	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
Trenngelpuffer					
4 x SDS	-	-	-	-	1,25 ml
Sammelgelpuffer					
Temed 1:333	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	15 µl
APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	50 µl
Gesamtvolumen	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	5 ml

Titingel

Zur Darstellung hochmolekularer gewichtiger Proteine wie Titin (3-4 MDa) wurden besonders großporige Polyacrylamid Gele gemäß Tabelle 8 mit einem Acrylamidanteil von 2,1% hergestellt. Diese wurden durch die Zugabe von 1,5%iger Argarose stabilisiert.

Zur Herstellung wurden zunächst alle Komponenten außer APS vermischt und auf 48°C im Wasserbad erhitzt. Zeitgleich wurde die Argarose in der Mikrowelle verflüssigt. Dann wurden APS und die flüssige Argarose hinzugegeben und das Gemisch zügig resuspendiert. Anschließend polymerisierte das Gel zwischen den Gelplatten für mindestens zwei Stunden. Die Proteinauftrennung erfolgte in 1x Laufpuffer bei einer Stromstärke von 5 mA pro Gel.

Tabelle 8: Pipettierschema für zwei Titingele

Lösung	Titingel 2,1%
30% Acrylamid	1,40 ml
H ₂ O bidest	6,67 ml
4 x SDS Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20%	100 µl
Temed	11,5 µl
APS	150 µl
Argarose 1,5%	6,67 ml

2.2.1.5 Gelelektrophorese

Es wurden die Gelelektrophoresysteme Mini-Twin des Herstellers Biometra und Mini-Protean der Firma Biorad verwendet.

Die Gelkammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt und die Geltaschen ausgespült, sodass sich dort keine Gelreste mehr befanden. Die Geltaschen wurden dann mittels Pipette mit der gewünschten Proteinmenge beladen. Ein Marker für den Molekulargößenbereich wurde in die erste Geltasche pipettiert. Die Gele liefen solange, bis die Bromphenolblaufront des Laufpuffers den unteren Gelrand überquerte.

2.2.1.6 Imperial Protein Stain

Zur Analyse der Titin Isoformen wurden die erstellten SDS – Page Gele für mindestens eine Stunde mit Imperial Protein Stain gefärbt, einer auf Coomassie Brilliant Blue basierenden Proteinfärbelösung. Der Farbstoff bindet an freie geladene Amino- und Iminogruppen von Proteinen im sauren Milieu. Zur vollständigen Entfärbung wurden die Gele bis zu 24h mit Imperial Destain entfärbt. Die nun sichtbaren Proteinbanden wurden nachfolgend am Fusion-FX7 Imager mit einem Durchlichtprogramm detektiert und digitalisiert. Zur Analyse des Isoformen-Verhältnisses wurden die Banden entsprechend ihrer Pixeldichte mittels der Software *ImageJ* quantitativ ausgewertet.

2.2.1.7 Westernblot

Eine weitere hier angewandte biochemische Methode ist das Westernblotting. Das Ziel ist, die im Gel aufgetrennten Proteine entlang eines elektrochemischen Gradienten auf eine PVDF Membran zu transferieren. Hierzu wurde ein 2-Puffersystem verwendet. Die Gele wurden auf eine in Ethanol aktivierte PVDF Membran gelegt. Gemäß dem Semidry-Blot-Verfahrens wurden unter sowie über dem Gel und der Membran Filterpapiere platziert. Unter der Membran befanden sich fünf in Anodenpuffer getränkte Whatmann Papiere. Darüber wurden fünf in Kathodenpuffer getränkte Papiere gelegt. Nach Beseitigung von möglichen Luftblasen wurden die Proteine für 12 Minuten (SDS – Gele) bzw. 20 Minuten (Titin – Gele) bei 1,5 Ampere und maximal 20 Volt in einer Trans Blot Turbo Apparatur auf die PVDF Membran übertragen.

Zur Überprüfung des Proteintransfers erfolgte anschließend eine reversible Anfärbung aller übertragenen Proteine auf der Membran mittels PVDF Stain. Danach wurde die Membran wieder für fünf Minuten mit PVDF Destain entfärbt und anschließend drei Mal für ca. 10 Minuten mit TBST Puffer gewaschen. Zuletzt erfolgte eine Blockierung der Proteinbindungsstellen mit 2%iger BSA Lösung für mindestens eine Stunde.

2.2.1.8 Immundetektion

Die Detektion der zu untersuchenden Zielproteine auf der Membran erfolgte mit Hilfe von Antikörpern, die mittels Chemilumineszenz nachgewiesen werden können. Bei der Untersuchung der Antikörper p62, LC3, PSMA2 erfolgte stets eine Beladungskontrolle mit Aktinin. Die Analyse des Phosphorylierungsstatus von Proteinen wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Hierbei wurden auf dieselbe Membran nacheinander *phospho* und *pan* Antikörper aufgetragen, sodass man den quantitativen Anteil der phosphorylierten Stellen des Proteins im Verhältnis zum Gesamtprotein errechnen konnte.

Bevor spezifische Primärantikörper zur Identifizierung von Proteinen aufgetragen werden konnten, mussten die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Hierfür wurden die Membranen für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur in TBST + 2%ige Rinderserumalbumin (BAS) Lösung gelegt. Anschließend wurde der benötigte Primärantikörper in einer 2%igen - BSA Lösung (3 ml) verdünnt und für mindestens 6h bei 4°C auf die Membran aufgetragen. Nach dieser Zeit erfolgten erneut drei 10-minütige Waschzyklen mit TBST Puffer. Anschließend wurde die Membran für mindestens eine Stunde mit einem Meerettich Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, der an den Primärantikörper gebunden hat. Nach weiteren Waschschritten konnten durch Zugabe des *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* die gewünschten Proteine mittels eines Chemlumineszenzimagers (FusionX) detektiert werden.

Sollte die Detektion einzelner Proteine sowohl mit einem phospho-spezifischen als auch mit einem nicht phospho-spezifischen Antikörpern erfolgen, wurden die Membranen zwischen den beiden Antikörpern mit Stripping Puffer behandelt. Dieser diente dazu, den phospho-spezifischen Antikörper von der Membran wieder zu entfernen. Anschließend konnten die Membranen erneut blockiert und mit dem nicht phospho-spezifischen Antikörper inkubiert werden.

2.2.1.9 Auswertung

Die quantitative Darstellung der Proteinbanden erfolgte anschließend mittels der Software *ImageJ*. Dabei wurde das jeweilige *phospho* Signal mit dem *pan* Signal in Verhältnis gesetzt. Analog dazu wurde das Bandensignal der p62, LC3, PSMA2 Antikörper mit der Beladungskontrolle Aktinin in Verhältnis gesetzt. Eine Normierung erfolgt mittels einer Dividierung der Werte durch den Mittelwert der Kontrollen des jeweiligen Blots. Es wurden daher relative Werte angegeben.

2.2.1.10 Software

Folgende Softwares wurden zusätzlich zur Auswertung und Erstellung der Arbeit verwendet: Microsoft Excel, Microsoft Power Point, Microsoft Word, GraphPad Prism, Adobe Photoshop CS6.

2.2.1.11 Datenanalytische Statistik

Für die statistische Verarbeitung der Daten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes (SD) über die jeweils angegebene Anzahl an unabhängigen Experimenten (n) bestimmt. Jeder Versuch wurde für die statistische Relevanz mindestens drei Mal wiederholt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism durch den Student's t-test bei zwei Gruppen und dem One way Anova bei drei Gruppen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt und statistische Signifikanz angenommen.

2.2.2 Proteasom Assay

2.2.2.1 Aufbau und Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Das Proteasom ist ein sich im Zytosol befindlicher Proteinkomplex. In eukaryotischen Zellen ist es für den Proteinabbau außerhalb der Lysosomen verantwortlich. Es besteht aus einer 20S und 19S Untereinheit. Zu den Aufgaben des Proteasoms zählen die intrazelluläre Protein-Qualitäts-Kontrolle und die Verhinderung der Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen.

Zu Beginn des Vorgangs werden fehlgefaltete oder veraltete Proteine sowie Signalpeptide durch Ubiquitin markiert und anschließend durch das 20S Proteasom degradiert. Bevorzugt werden nun Peptidbindungen hinter sauren (Caspase ähnliche Aktivität), basischen (Trypsin ähnliche Aktivität) und hydrophoben (Chymotrypsin ähnliche Aktivität) Aminosäuren gespalten, sodass kurze Peptide entstehen, die wieder aus dem Proteasom freigesetzt werden. Das UPS wird durch zahlreiche Einflüsse beeinflusst und kann insgesamt in seiner Aktivität erhöht oder vermindert sein.

2.2.2.2 Messung der Proteasomaktivität

Für die vorliegende Arbeit wurden das Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Assay und das Proteasome-Glo™ Trypsin-Like Assay verwendet. Diese beiden Assays überwachen zwei der drei katalytischen Aktivitäten des Proteasoms. Das zu untersuchende Gewebe wurde zunächst zu einem Lysat verarbeitet, indem sich neben der DNA die Proteasomen befinden.

5 mg des Gewebes wurden dafür in 2,5 µl EDTA (100 mM) + 50 ml PBS gelöst und mit Hilfe eines Homogenisators für 5 Sekunden homogenisiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss des Gewebes mittels Ultraschall. Im nächsten Schritt wurde die Probe 15 Minuten lang bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Proteingehalt wurde mittels einer BSA Standardreihe (BCA Assay) bestimmt (Abb. 6). In neun Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde ein Diluent aus einer PBS und EDTA Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde die BSA-Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen mittels Pipette befüllt.

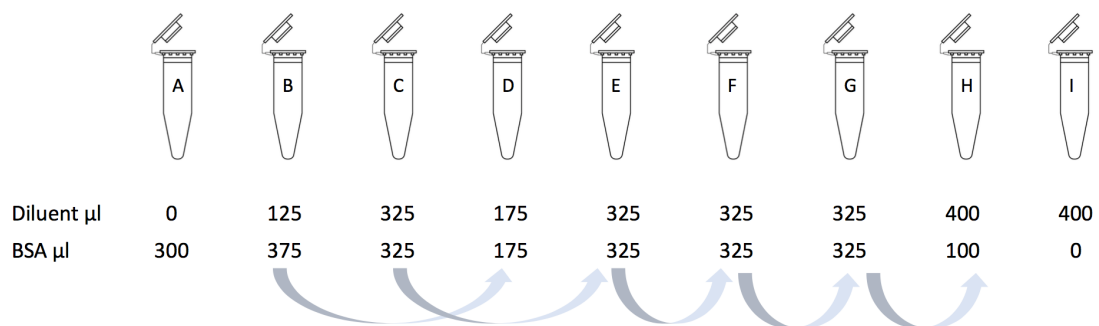


Abbildung 6 BSA Verdünnungsreihe.

Zum Gewebelysat mit 10 µg Proteingehalt wurden luminogenische Aminoluciferin-Substrate hinzugegeben, die jeweils an die Signalpeptide *SucLLVY* und *ZLRR* gekoppelt sind, welche von der Chymotrypsin und Trypsin Aktivität des 20S Proteasom

Anteils erkannt werden. Zur Aktivierung der Proteasome wurde anschließend in einem Verhältnis von 1:1 das Proteasom-Glo-Reagenz hinzugegeben und anschließend nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° Celsius luminometrisch gemessen. Das resultierende Lumineszenzsignal (relative Lichteinheiten, RLU) ist proportional zur Peptidase Aktivität (Abb. 7). Die Proteasomaktivität wurde auf die in den Lysaten vorhandene Proteasommenge normiert.

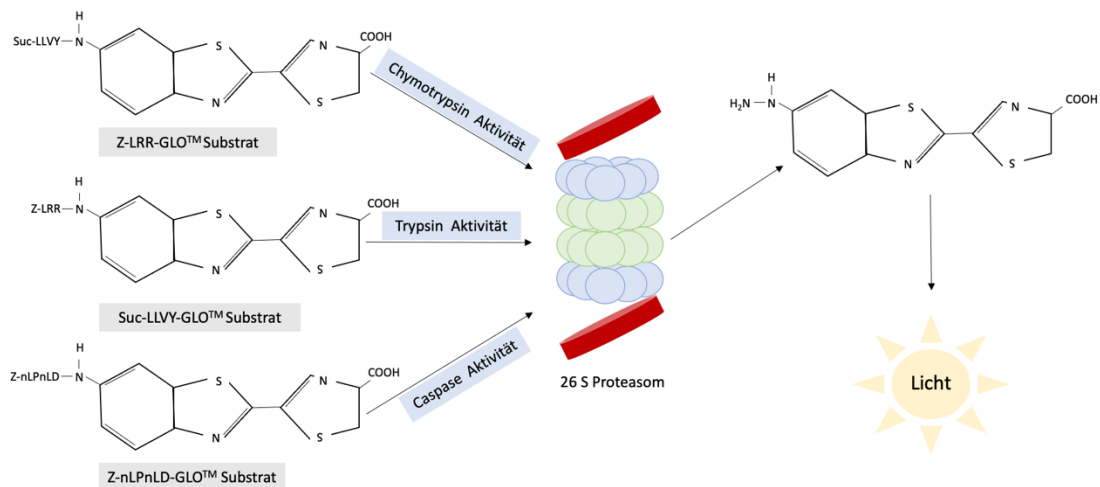


Abbildung 7 Messung der Proteasomaktivität.

Die Proteasom-Aktivität schneidet ein luminogenes Substrat. Dadurch wird Aminoluciferin in Luciferin umgesetzt. Die Luciferase setzt dieses wiederum in ein Lichtsignal um, das proportional zur Proteasom-Aktivität ist.

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswirkungen des Diabetes Mellitus auf das Autophagolysosomale-System

Um die Auswirkungen des Diabetes Mellitus auf das Autophagolysosomale-System zu analysieren, wurden die Proteinlevel von verschiedenen Autophagie bezogenen Proteinen (ATG's) mittels Westernblot gemessen. Zu den untersuchten Proteinen gehört LC3-I sowie die lipidierte Form LC3-II, p62/SQSTM1, sowie die Regulatorproteine mTOR und AMPK α . Die Proteine gelten als wichtige Marker zur Quantifizierung des Proteinflusses. Die ermittelte Proteinmenge wurde für LC3-I, LC3-II und p62 auf das Proteinlevel von α -Aktinin normiert. Für mTOR und AMPK α wurden die Pan Antikörper als Beladungskontrolle verwendet. Ein Graph stellt jeweils die Analyse Ergebnisse des Psoas Muskels und des Quadriceps Muskels für die STZ Ratten (T1DM Modell) und Placebo sowie Enalapril behandelten ZSF1 Ratten (T2DM Modell) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren dar.

3.1.1 Signifikant erhöhte LC3-II Level im M. Psoas und M. Quadriceps der STZ-Ratten (T1DM Modell)

Zur Bestimmung der Autophagieaktivität wurde zunächst das Proteinlevel von LC3-II, der lipidierten Form von LC3-I, per Westernblot Analyse quantifiziert.

Im Psoas Muskel der STZ Ratten zeigten sich im Vergleich zu Kontrollratten mit einem Wert von $4,2 \pm 2,2$ signifikant erhöhte LC3-II Level (Abb. 8A) und die LC3-II/I Relation war mit einem Wert von $2 \pm 0,8$ ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 8C). Die Placebo sowie Enalapril behandelten ZSF1 Ratten wiesen insgesamt lediglich marginal erhöhte LC3-II Gesamtlevel (Abb. 8A), jedoch in Relation zu LC3-I marginal verminderte Gesamtlevel (Abb. 8C) vor.

Im Quadriceps Muskel der STZ Ratten ließen sich ähnliche Tendenzen nachweisen. Es präsentierte sich insgesamt mit einem Wert von $2 \pm 0,7$ ein signifikant höheres LC3-II Gesamtlevel (Abb. 8B) und mit $2,3 \pm 0,8$ eine signifikant erhöhte LC3-II/LC3-I Ratio (Abb. 8D). Die diabetischen ZSF1 Ratten zeigten lediglich eine verminderte LC3-II/LC3-I Ratio (Abb. 8D), während die Gesamtwerte von LC3-II annähernd den Werten der Kontrolltiere glichen (Abb. 8B).

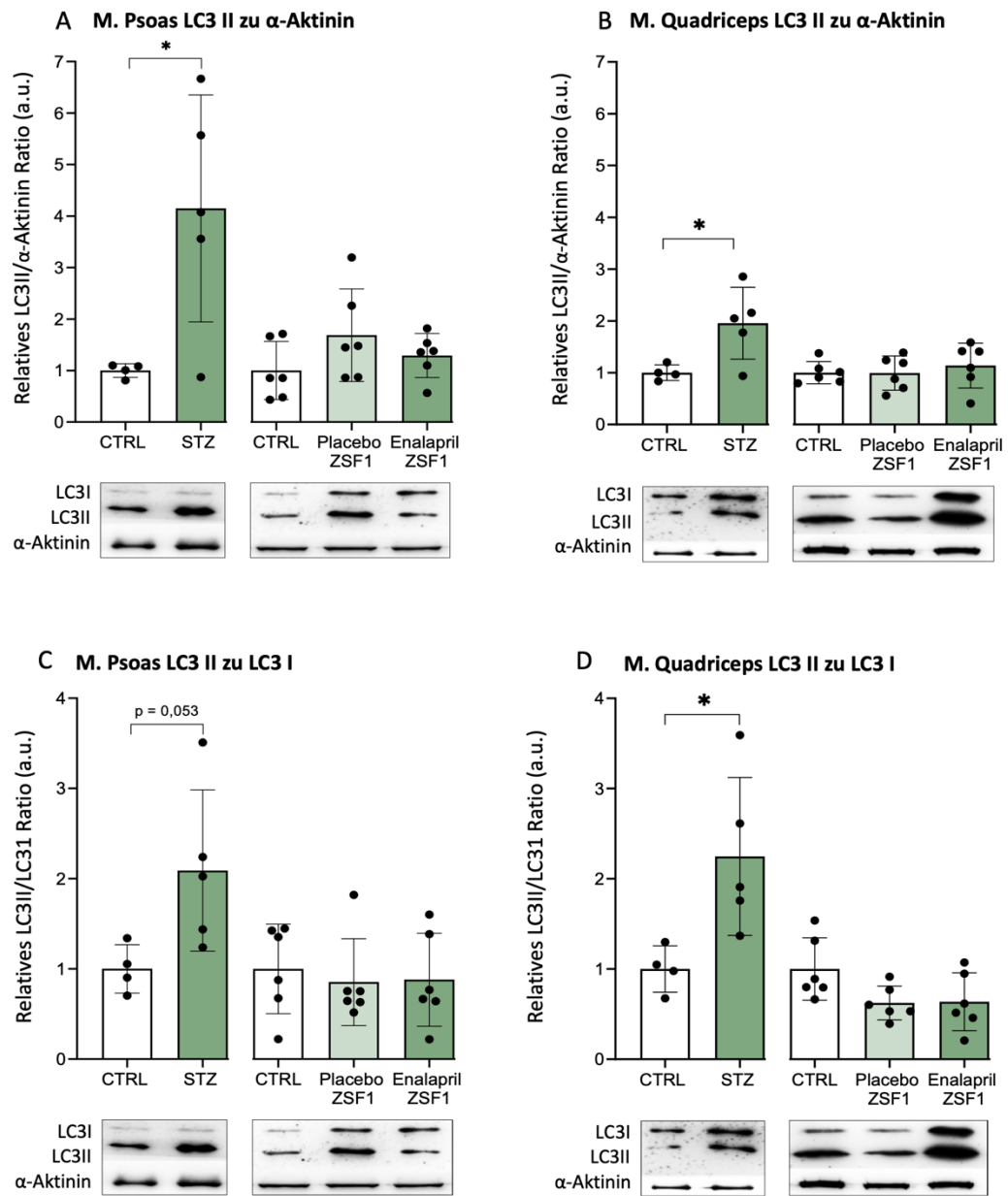


Abbildung 8 Ergebnisse zur Bestimmung des Gesamt LC3-II Proteinlevels.

Westernblotanalysen zur Bestimmung des LC3II Proteinlevels in Relation zum α -Aktinin Proteinlevel (**A+B**) und der LC3-II/I Ratio (**C+D**) in M. Psoas und M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

3.1.2 p62/SQSTM1 Level

Neben LC3 ist auch das Ankerprotein p62/SQSTM1 ein bekannter Marker des Autophagieflusses. Da es im Inneren des Autophagosoms lokalisiert ist, wird es ebenfalls im Zuge der Autophagie abgebaut.

Im M. Psoas (Abb. 9A) zeigten Typ-1 diabetische STZ Ratten tendenziell im Vergleich zu Kontrollen mit $1,5 \pm 0,5$ eine Erhöhung des p62/SQSTM1 Proteinlevels. Placebo und Enalapril behandelte Typ-2 diabetische ZSF1 Ratten präsentierten im Vergleich zu Kontrollen verringerte p62/SQSTM1 Proteinlevel.

Im M. Quadriceps (Abb. 9B) sind die p62/SQSTM1 Level der STZ Ratten praktisch nicht verändert. Placebo behandelte und Enalapril behandelte Typ-2 diabetische ZSF1-Ratten weichen ebenfalls nur marginal vom p62/SQSTM1 Proteinlevel der Kontrolltiere ab.

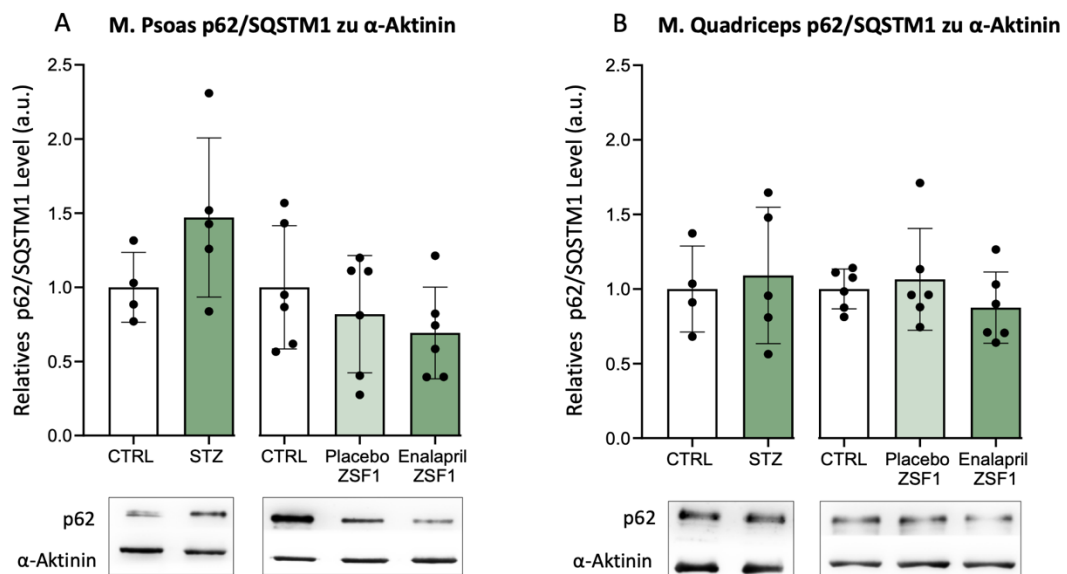


Abbildung 9 Ergebnisse zur Bestimmung des p62/SQSTM1 Proteinlevels.

Westernblotanalysen zur Bestimmung des p62/SQSTM1 Proteinlevels in Relation zum α -Aktinin Proteinlevel in **(A)** M. Psoas und **(B)** M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

3.1.3 Aktivitätsniveau der mTOR und AMP-Kinase alpha

Eine zentrale Rolle in der Regulation der Autophagie Regulatoren nehmen die Kinasen mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und AMPK α (AMP-aktivierte Proteinkinase alpha) ein. Unter nährstoffreichen Bedingungen wird mTOR vermehrt durch eine Phosphorylierung aktiviert und führt damit zu einer Inhibition der Autophagie. Bei unzureichender Nährstoffversorgung führt die Aktivierung der AMP-Kinase alpha zur Aktivierung der Autophagie.

Im M. Psoas (Abb. 10A) der STZ Ratten stellte sich tendenziell eine geringe Erhöhung des phosphorylierten mTORs ($1,2 \pm 0,1$) dar. Im M. Quadriceps (Abb. 10B) zeigte sich eine Erhöhung des Levels von $1,3 \pm 0,2$. Die ZSF1 Gruppen beider Muskeln zeigten nur marginale Unterschiede ohne eindeutigen Trend.

Die phospho-AMPK Level im Psoas Muskel der STZ Ratten lagen (Abb.11A) mit $0,5 \pm 0,3$ deutlich unter denen der Kontrolltieren, im Quadriceps Muskel (Abb.11B) mit $0,5 \pm 0,3$ ebenfalls. Die Enalapril behandelte ZSF1 Gruppe zeigte im M. Psoas (Abb.11A) zwar höhere Werte im Vergleich zu Kontrolle, jedoch ohne Signifikanz. Die Placebo Gruppe wies im Vergleich verringerte Level auf. Im M. Quadriceps (Abb. 11B) präsentierte die Enalapril Gruppe leicht verringerte phospho-AMPK Level, die Placebo Gruppe zeigte keinen Unterschied.

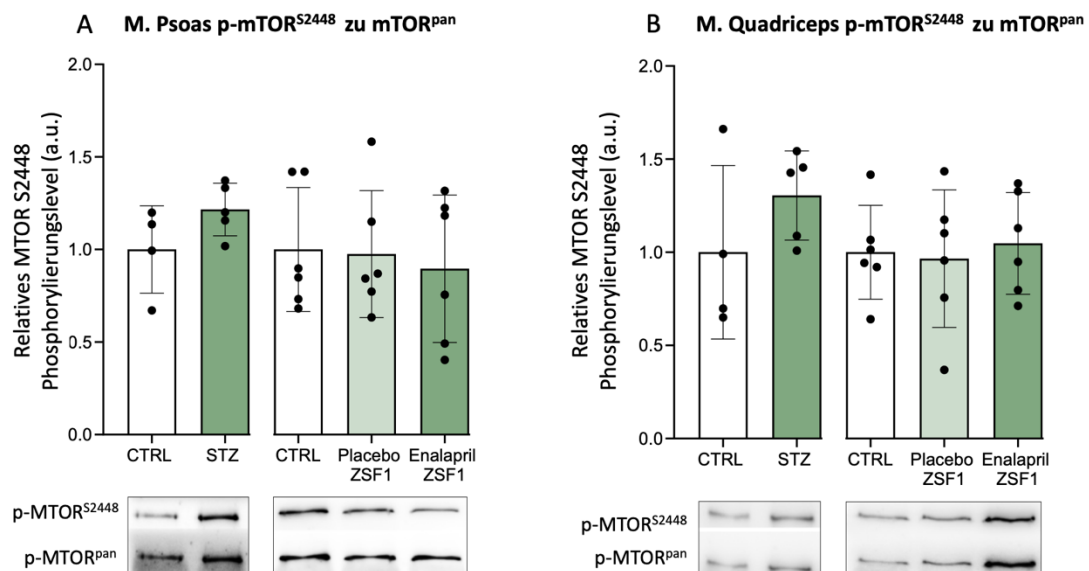


Abbildung 10 Ergebnisse zur Bestimmung der mTOR Aktivität.

Westernblotanalysen zur Bestimmung des Phosphorylierungslevels der Proteinkinase mTOR^{S2448} in Relation zu mTOR^{pan} in **(A)** M. Psoas und **(B)** M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots

dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

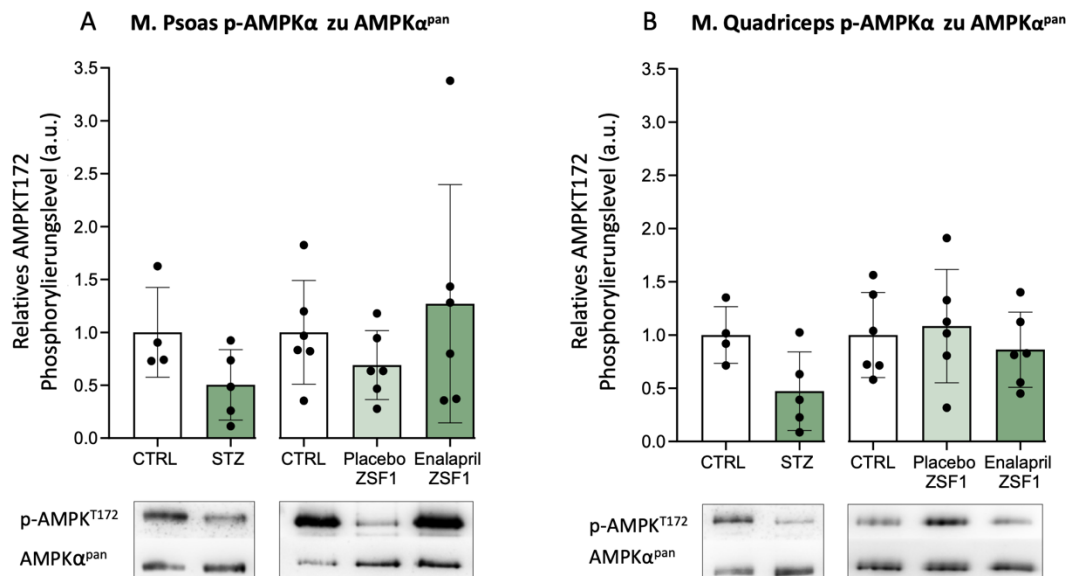


Abbildung 11 Ergebnisse zur Bestimmung der AMPK Aktivität.

Westernblotanalysen zur Bestimmung des Phosphorylierungslevels der Proteinkinase AMPK^{T172} in Relation zu AMPK^{pan} in **(A)** M. Psoas und **(B)** M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normalisiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

3.2 Auswirkung des Diabetes Mellitus auf die K63-abhängige Titinubiquitinierung und den Titin Turnover

Da eine Beteiligung des Autolysosomalen- und Ubiquitin-Proteasom-Systems am Abbau von Titin anzunehmen ist (Kötter et al., 2014), können Störungen innerhalb der intrazellulären Proteindegradations-Maschinerie weitreichende Folgen für den Abbau von Titin und seine Verankerung im Sarkomer haben. Allerdings könnte auch allein die diabetische Stoffwechsellage zu einem veränderten Titin Turnover im Sarkomer führen.

Zur Untersuchung einer potentiellen Veränderung der Titin-Degradation wurde zunächst die K63 abhängige Ubiquitinierung des Titins untersucht. Diese Art der Markierung von Substraten ist ein Signal für die Degradation über die Autophagie (Tan et al., 2008). Die K63-abhängigen Ubiquitinierung von Titin war im M. Psoas der STZ Ratten (Abb. 12A) mit einem Wert von $1 \pm 0,3$ praktisch unverändert. Die Enalapril behandelten ZSF1

Ratten im M. Psoas (Abb. 12A) lagen mit einem Wert von $0,8 \pm 0,3$ unter den Kontrollen und leicht über den Placebo behandelten Ratten mit einem Wert von $0,7 \pm 0,1$.

Die K63 abhängige Ubiquitinierung im M. Quadriceps von STZ Tieren (Abb. 12B) zeigte sich mit $0,74 \pm 0,3$ leicht vermindert im Vergleich zu Kontrollen. Die Placebo und Enalapril behandelten ZSF1 Ratten (Abb. 12B) zeigten eher leicht verminderte K63-Ubiquitinierungstendenzen. Die Enalapril behandelten ZSF1 Ratten im M. Quadriceps lagen mit $0,8 \pm 0,3$ auf demselben Level wie im M. Psoas. Die Placebo behandelte Gruppe wies im Vergleich mit der Enalapril Gruppe mit $0,9 \pm 0,4$ ein leicht höheres Ubiquitinierungslevel auf.

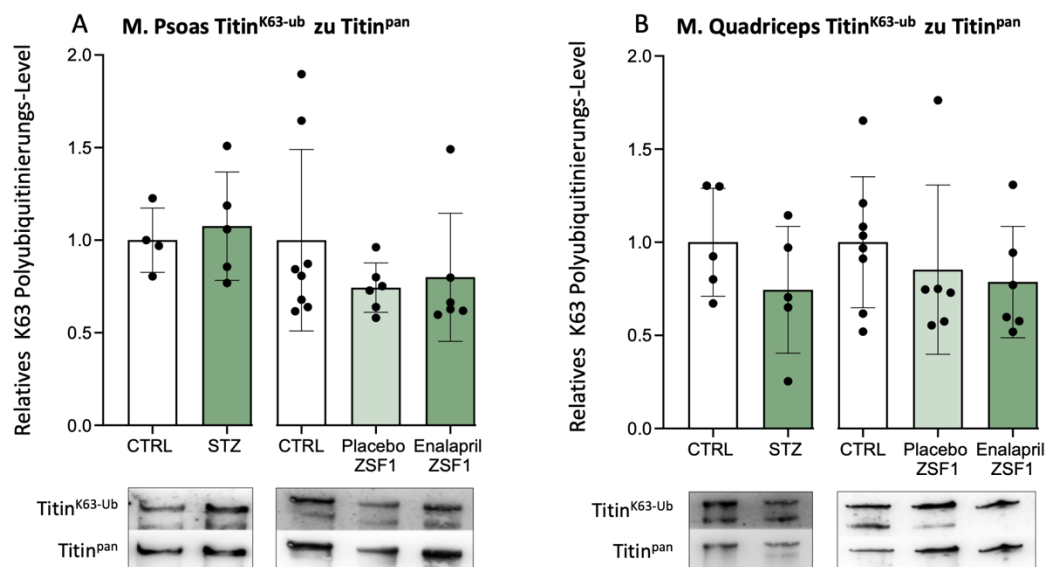


Abbildung 12 K63-Ubiquitinierungslevel von Titin.

Westernblotanalysen zur Bestimmung des K63 Ubiquitinierungslevels von Titin in Relation zum Titin^{pan} Proteinlevel in (A) M. Psoas und (B) M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

3.2.1 Signifikant erhöhter Titin Turnover im T1DM Modell

Um einen möglichen Effekt auf den Abbau des *full length* Titin (T1) zum spezifischen Titin Abbauprodukt (T2) zu untersuchen, wurde das Verhältnis von T2 zu T1 auf Coomassie gefärbten 2,1% SDS-PAGE bestimmt.

Während STZ Ratten im M. Psoas (Abb. 13A) eine signifikant erhöhte Turnover Rate ($1,5 \pm 0,2$) des *full length* Titin (T1) zur Degradationsbande (T2) zeigten, wiesen die ZSF1

Ratten dahingehend nur marginal verminderte T2/T1 Ratios vor. Ebenso verhielt es sich mit den ZSF1 Ratten im Proben des M. Quadriceps. Die STZ Ratten zeigten im M. Quadriceps (Abb. 13B) jedoch eine Verringerung der T2/T1 Ratio ($0,7 \pm 0,4$), die aufgrund der hohen Streubreite der Werte jedoch nicht signifikant war.

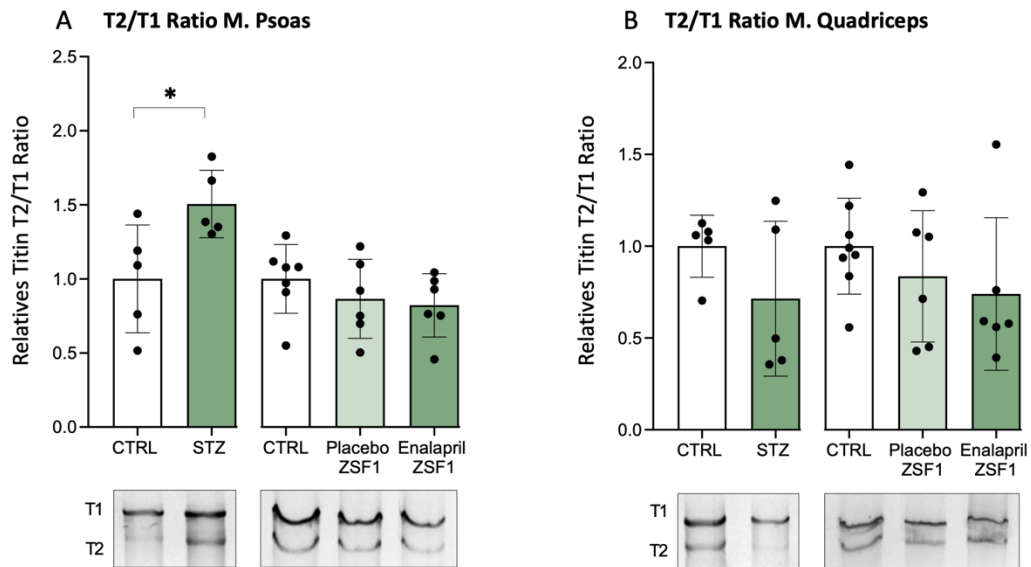


Abbildung 13 Bestimmung der Titin Degradation.

SDS-Page Gelelektrophorese Analysen zur Bestimmung des T2/T1 Verhältnisses von Titin in **(A)** M. Psoas und **(B)** M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Der Abbau wurde durch das Verhältnis des typischen Titin Abbauprodukts (T2) im Verhältnis zum Gesamt Titin quantifiziert. Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Gele dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

3.3 Auswirkungen des Diabetes Mellitus auf die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems

3.3.1 PSMA2 Level

Es ist bekannt, dass die Inhibition der Autophagie auch zur Beeinträchtigung der proteasomalen Degradation und damit auch zur Akkumulation ubiquitinerter Substrate sowie deren Aggregaten führt. Zur näheren Untersuchung dieser Aussage wurde zunächst der PSMA2 Gehalt gemessen. PSMA2 (*proteasomal subunit alpha type-2*) ist eine Untereinheit des 20S Proteasoms. In dieser Studie wurde diese Untereinheit als Marker für die quantitative Menge an Proteasomen innerhalb einer Zelle verwendet. In

Abb. 14 ist das Ergebnis der Analyse des relativen PSMA2 Gehalts in Bezug auf die Beladungskontrolle α -Aktinin zu sehen.

Im M. Psoas der STZ Ratten (Abb. 14A) zeigten sich mit einem Wert von $1,9 \pm 1,4$ tendenziell erhöhte PSMA2 Werte, jedoch mit einer hohen Streubreite der Daten. Die Placebo und Enalapril behandelten ZSF Ratten wiesen gleichwertig leicht verminderte PSMA2 Werte vor. Die Enalapril behandelte Gruppe lag bei $0,6 \pm 0,8$, die Placebo behandelte Gruppe bei $0,7 \pm 0,3$. Im Gegensatz dazu zeigte sich im M. Quadriceps der STZ Ratten (Abb. 14B) mit $0,7 \pm 0,2$ ein verminderter PSMA2 Gehalt. In der Placebo behandelten ZSF1 Gruppe fiel ein im Vergleich zu Kontrollen erhöhter Wert von $1,3 \pm 0,3$ auf. Die Enalapril Gruppe zeigte keinen nennenswerten Unterschied.

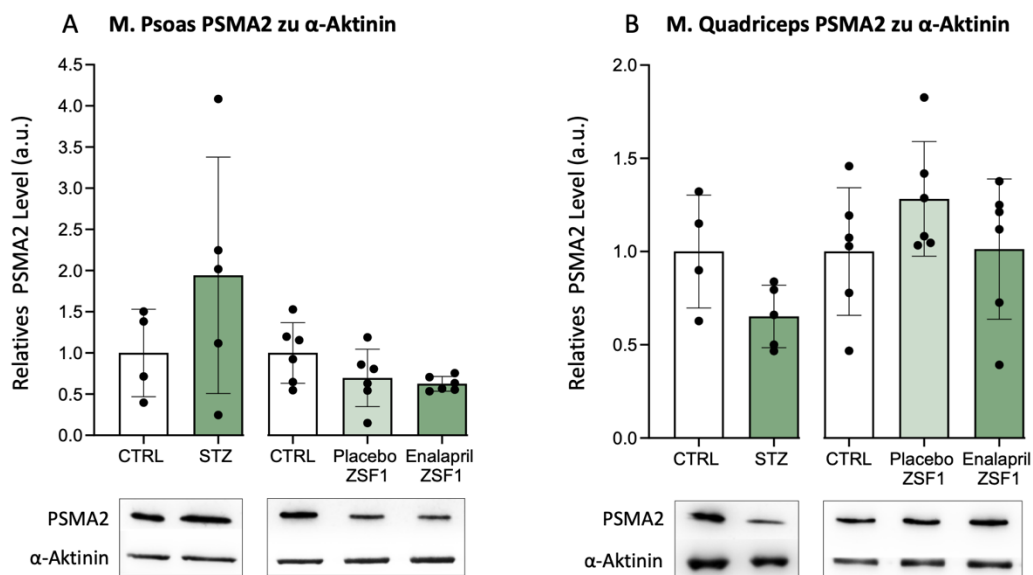


Abbildung 14 Ergebnisse zur Bestimmung des PSMA2 Proteinlevels.

Westernblotanalysen zur Bestimmung des PSMA2 Proteinlevels in Relation zum α -Aktinin Proteinlevel in **(A)** M. Psoas und **(B)** M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* für STZ und *One-Way-Anova* für ZSF1). a.u. = arbitrary units.

3.3.2 Messung der Proteasom Aktivität

Zur weiteren Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Autophagie und der proteasomalen Degradation wurden zwei der drei bekannten Enzymaktivitäten des Proteasoms mittels eines Lumineszenz- basierten Assays gemessen. Analysiert wurden die Trypsin-like und Chymotrypsin-like Aktivitäten des Proteasoms. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrollen normiert. Da trotz gleichmäßig verwendeter Proteinmenge (100 ug) unterschiedlich viel Proteasomgehalt in den Lysaten vorhanden war, wurden die erhaltenen Ergebnisse auf den Gehalt an PSMA2 in den Lysaten normiert.

3.3.2.1 *Proteasomaktivitäten im M. Psoas und M. Quadriceps des T1DM Modell*

Die Messung der Enzymaktivitäten von Kontrollen und STZ-behandelten Ratten im M. Psoas ist in Abb. 15A dargestellt. In den STZ Geweben lag die relative Chymotrypsin-like Enzymaktivität bei $2,9 \pm 1,4$ und war somit signifikant höher als in den Kontrollen. Der entsprechende Trypsin-like Aktivitätswert lag bei $2,2 \pm 0,7$ und war damit ebenfalls signifikant höher als die Aktivität in den Kontrollen.

Für die Chymotrypsin Enzymaktivität der STZ Ratten im M. Quadriceps (Abb. 15B) wurde mit einem Wert von $2 \pm 1,5$ eine klare Tendenz zur Erhöhung beobachtet, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Trypsin-Aktivität zeigte ebenfalls eine leichte, nicht signifikante Erhöhung mit einem Wert von $1,4 \pm 0,4$.

In Abb. 15C ist zu erkennen, dass die mit der Placebolösung behandelten ZSF1 Ratten jeweils eine Erhöhung der Chymotrypsin und Trypsin Aktivität im Gewebe des M. Psoas im Vergleich zu Kontrollen zeigen. Die Chymotrypsin Aktivität lag bei $1,6 \pm 0,3$ und ist damit annähernd signifikant ($p=0,054$) höher. Die Trypsin-like Aktivität ist mit dem Mittelwert von $1,8 \pm 0,3$ signifikant höher ($p=0,0091$). In den Enalapril behandelten ZSF1 Ratten war lediglich ein schwacher Aktivitätsanstieg im Vergleich zu Kontrollen zu verzeichnen.

Die relativen Chymotrypsin Aktivitätswerte für die M. Quadriceps Proben der ZSF1 Ratten zeigten insgesamt eine hohe Streubreite (Abb. 15D). Die Chymotrypsin Aktivität der Enalapril behandelten ZSF1 Ratten zeigte mit Mittelwert von $2,2 \pm 1,3$ zwar eine deutliche Tendenz zur Erhöhung im Vergleich zu Kontrollen, allerdings ohne Signifikanz. Die Trypsin Aktivitäten der ZSF1 Ratten lagen wie in Abb.16D zu erkennen sehr nah an den Werten der Kontrolltiere und waren nur geringfügig erhöht.

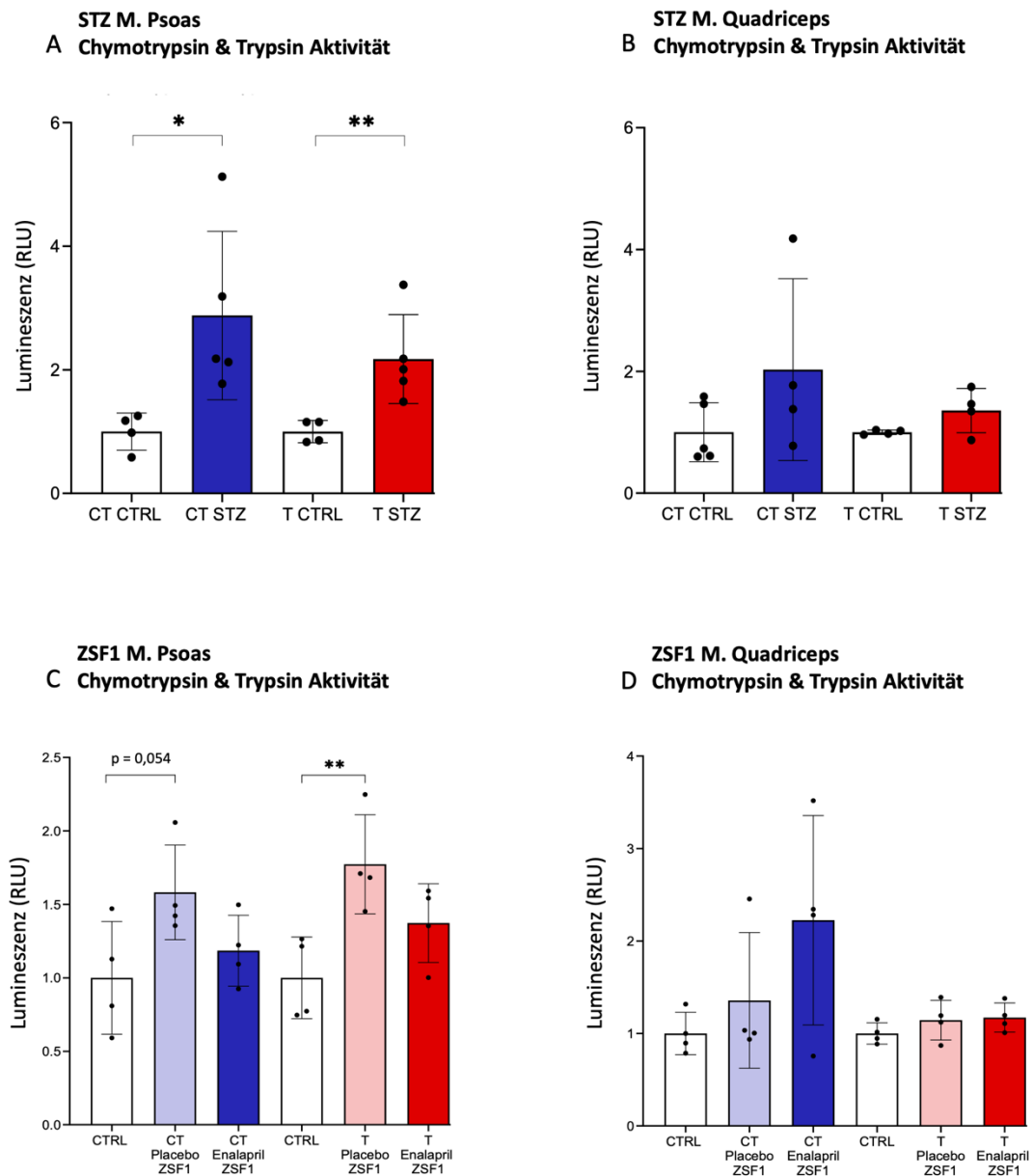


Abbildung 15 Darstellung der Proteasomaktivitäten.

Darstellung der Chymotrypsin-like und Trypsin-like Proteasomaktivitäten im M. Psoas (**A+C**) und im M. Quadriceps (**B+D**) der STZ und ZSF1 Ratten, normiert auf Kontrollen und zusätzlich auf die in den Gewebelysaten ermittelte Proteasommenge. Die Proteasomaktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

3.4 Auswirkungen des Diabetes Mellitus auf die K48-abhängige Titinubiquitinierung

3.4.1 Marginale Veränderung der K48 Titin-Ubiquitinierung

Die K48-abhängige Ubiquitinierung markiert Substrate für den Abbau über das Proteasom (Gallastegui et al., 2010). Trotz der nachgewiesenen erhöhten Proteasom Aktivität ergaben sich bezüglich der K48-abhängige Ubiquitinierung unterschiedliche Tendenzen. Im Psoas Muskel der STZ Ratten (Abb. 16A) zeigten sich mit einem Wert von $1,12 \pm 0,3$ im Vergleich zu Kontrollen leicht erhöhte Werte. In den ZSF1 Ratten zeigte sich im M. Psoas der Placebo behandelten Tieren ($0,9 \pm 0,3$) sowie in der Enalapril behandelten Gruppe ($0,8 \pm 0,2$) ein verringertes K48-Ubiquitinierungslevel.

Im Quadriceps Muskel der STZ Ratten (Abb. 16B) lag das K48 Ubiquitinierungs Level nur marginal unterhalb der Kontrollen. Die Ubiquitinierungslevel der ZSF1 Ratten ähnelten der Tendenz im M. Quadriceps, da auch die Placebo- ($0,74 \pm 0,3$) und die Enalapril behandelten ($0,7 \pm 0,4$) ZSF1-Ratten unter den Kontrollwerten lagen.

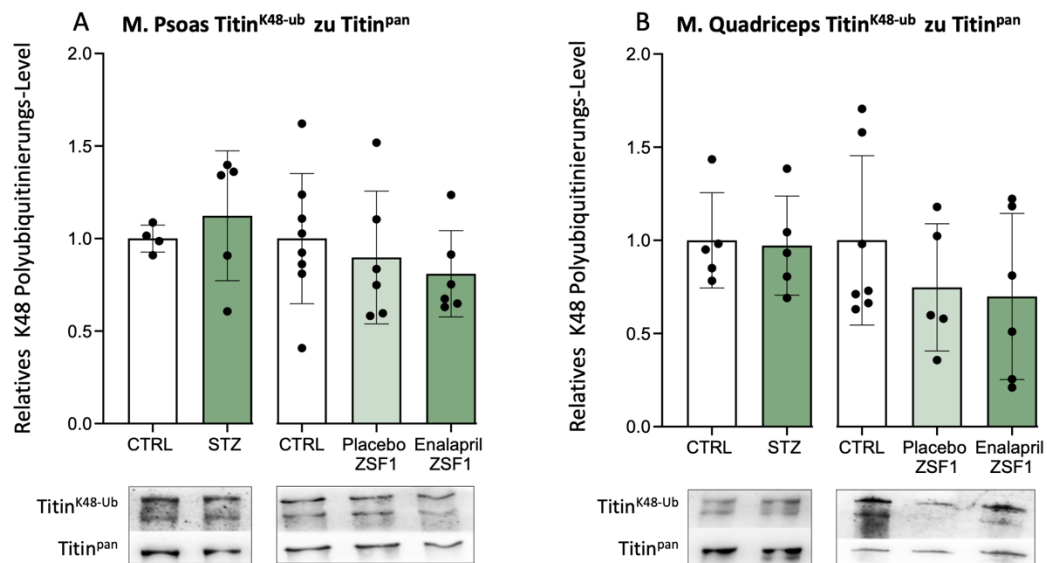


Abbildung 16 K48-Ubiquitinierungslevel von Titin.

Westernblotanalysen zur Bestimmung des K48 Ubiquitinierungslevels von Titin in Relation zum Titin^{pan} Proteinlevel in (A) M. Psoas und (B) M. Quadriceps der STZ (T1DM-Modell) und ZSF1 Ratten (T2DM-Modell). Unter den Graphen sind repräsentative Bilder der analysierten Blots dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD angegeben und normiert auf die Kontrollen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Asterisken gekennzeichnet ($p < 0,05$ im *Student's t-Test* und *One-Way-Anova*). a.u. = arbitrary units.

3.5 Größenvergleich von Titin im Skelettmuskel

Die Skelettmuskulatur exprimiert das sogenannte N2A Titin. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich aufgrund der mittleren Ig-Region und der PEVK Domäne. Es ist anzunehmen, dass ein bestimmter Muskeltyp mit der Größe von Titin korreliert, da schnelle Muskeln kurzes und steifes Titin, langsame Muskeln langes und nachgiebiges Titin exprimieren (Prado et al., 2005). Es ist bekannt, dass Diabetes einen großen Einfluss auf den Titin-Isoformenswitch im Herzmuskel hat. Fraglich ist, ob auch das N2A Titin im Skelettmuskel in seiner Größe davon beeinflusst wird. Zum Größenvergleich der Titinisoform im Skelettmuskel wurden mittels 2,1% SDS-Page jeweils der Psoas- und der Quadricepsmuskel im STZ (T1DM) und ZSF1 (T2DM) im Vergleich zu Kontrollen nebeneinander aufgetragen. In der jeweils dritten Geltasche wurden der Psoas und Quadriceps Muskel zusammen aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt. Es ließen sich keine Unterschiede im Größenvergleich der Muskeln darstellen.

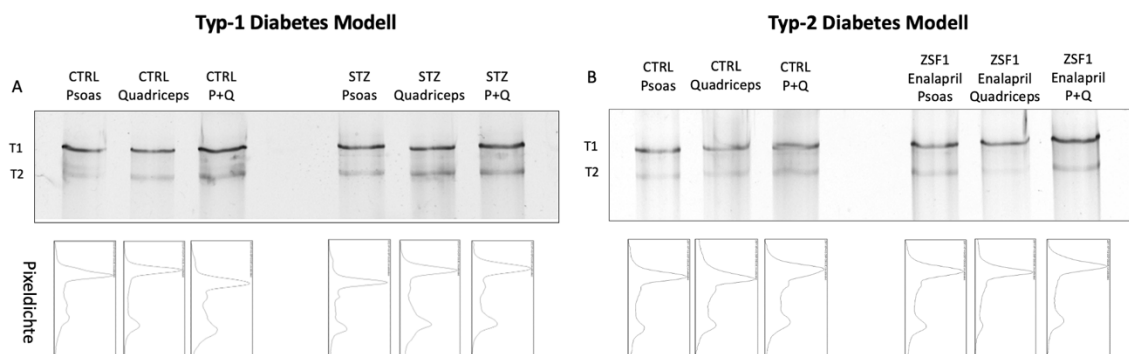


Abbildung 17 Titin Isoformen in Skelettmuskeln von STZ und ZSF1 Ratten

Darstellung eines Größenvergleichs von Titin im M. Psoas und M. Quadriceps im T1DM (STZ) und T2DM (ZSF1) Modell auf einem Coomassie gefärbten Gel. Außerdem Darstellung der Pixeldichte. Markierung des *full length* Titin (T1) sowie der Titin Degradationsbande (T2). **(A)** Titin Vergleich im Psoas und Quadriceps Muskel in Kontroll und STZ Muskelgewebe. Beladung der dritten Tasche mit beiden Muskeln. **(B)** Titin Vergleich im Psoas und Quadriceps Muskel in Kontroll und Enalapril behandeltem ZSF1 Gewebe. Beladung der dritten Tasche mit beiden Muskeln.

4 DISKUSSION

4.1 Messung des autophagischen Flusses

Im ersten Teil der Studie wurde der Einfluss von T1DM und T2DM auf die Proteindegradationsmechanismen innerhalb der Skelettmuskelzellen von Psoas und Quadriceps Muskeln untersucht. Um die Aktivität der Autophagie genau abzuschätzen muss der „Autophagie Fluss“ bestimmt werden, der als Ausmaß der autophagischen Abbauaktivität definiert ist (Loos et al., 2014; Yoshii et al., 2017). Hierfür wurden die Expressionsniveaus verschiedener autophager Proteine gemessen und interpretiert.

In den meisten Westernblot-Studien wird LC3-II als Substrat für die Schätzung des autophagischen Flusses herangezogen, da es mit der Menge der Autophagosomenbildung korreliert (Kuma et al., 2010; Loos et al., 2014). Die Interpretation der LC3-II-Spiegel unterliegt jedoch Einschränkungen, insofern als LC3-II während der Autophagie sowohl produziert als auch abgebaut wird (Ju et al., 2010). Eine Erhöhung der Menge an endogenem LC3-II kann unter drei Bedingungen auftreten: Erstens durch die Lipidierung von LC3-I zur Bildung von LC3-II während der Autophagosomenbildung. Zweitens durch die Hemmung der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen und drittens durch die Hemmung des lysosomalen Abbaus (Tanida et al., 2005). So kann jeweils eine Aktivierung sowie auch eine Inhibierung der Autophagie zu einer Erhöhung des LC3-II Levels führen. Wird die Autophagie in einem früheren Schritt geblockt, kommt es aufgrund eines gestörten lysosomalen Abbaus autophagolysosomaler Proteine zu einem verminderten LC3-II Spiegel (Wang et al., 2013). Der Untersuchungsansatz zur Messung einzelner Autophagie-assoziiierter Proteine unterliegt daher Einschränkungen und sollte immer im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen, z.B. p62/SQSTM1 und den Schlüsselregulatoren mTOR und AMPKα betrachtet werden.

Zur Blockierung der Autophagie in *in-Vitro*-Experimenten wird häufig der lysosomale Inhibitor Chloroquin verwendet. Durch die Zugabe von Chloroquin wird die Autophagosom-Lysosom-Fusion unterbunden und der lysosomale pH-Wert erhöht, was zu einem Anstieg der Proteinlevel von LC3-II und p62 führt (Shintani et al., 2004). Zur Aktivierung der Autophagie kommt häufig das bekannte Antidiabetikum Metformin zum Einsatz, da es den autophagolysosomalen Substratabbau über die Aktivierung der AMPKα auslöst (Zhou et al., 2001). Metformin reduziert die durch Chloroquin induzierte Akkumulation von p62 und LC3-II, was auf eine Induktion des autophagischen Flusses

hinweist (De Santi et al., 2019). Diese Erkenntnisse wurden richtungsweisend zur Interpretation der Autophagiemarker-Level herangezogen.

4.2 Insulinwirkung im diabetischen Skelettmuskel

Die unzureichende Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase unterliegt sowohl dem T1DM als auch dem T2DM. Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Diabetestypen betrifft jedoch die Produktion und Wirkung des Hormons Insulin. Bei Typ-1 Diabetes entsteht aufgrund einer Zerstörung der pankreatischen Beta Zellen ein metabolischer Zustand der absoluten Insulinopenie (Guthrie et al., 2004). Typ-2 Diabetes ist durch eine Insulinresistenz charakterisiert, die eine verminderte Ansprechbarkeit des insulinsensitiven Gewebes auf normale Plasmakonzentrationen von Insulin beschreibt und zu einer Glukoseintoleranz führt (Rizza et al., 1981). Im Frühstadium der Erkrankung produzieren die Bauchspeicheldrüsenzellen zum Ausgleich zunächst übermäßig viel Insulin, scheitern aber schließlich daran und erleiden Apoptose (Meijer et al., 2007).

Die Skelettmuskulatur stellt den wichtigsten Ort der insulinstimulierten Glukoseaufnahme dar (Kruse et al., 2015). Insulin ist in der Skelettmuskulatur in mehrere intrazelluläre Signalkaskaden miteingebunden, wie die Stimulation für den Glukosetransport, die Proteinsynthese und die Autophagie (Boucher et al., 2014). Im Skelettmuskel wird Autophagie durch Fasten, Atrophie und Bewegung induziert (Kruse et al., 2015) und durch Insulin über eine verminderte Autophagosomenbildung unterdrückt (Ehrlicher et al., 2018; Naito et al., 2013). Bisher ist jedoch nur wenig über die Aktivität der Proteindegradationsmaschinerie in insulinresistenten Zuständen veröffentlicht, obwohl insbesondere die weitreichenden Folgen der Insulinresistenz im Fokus der klinischen Wissenschaft stehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zielen darauf ab, einen wichtigen Beitrag zu einem Erkenntnisgewinn auf diesem Gebiet leisten.

4.3 Effekte des T1DM auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle

4.3.1 Das Autophagolysosomale-System

Zur Untersuchung der Auswirkung des T1DM auf die Autophagie wurden gesunde Kontrollratten mit Typ-1 diabetischen STZ Ratten verglichen. Insbesondere im M. Psoas

der STZ Ratten stellten sich deutliche Veränderungen autophagischer Proteinlevel dar. Es war ein signifikanter Anstieg von LC3-II insgesamt und der LC3-II/I Ratio, sowie ein nicht signifikanter Anstieg von p62/SQSTM1 zu verzeichnen. Die Aktivität der inhibitorischen Regulatorkinase mTOR war leicht erhöht, die AMPK α Aktivität leicht verringert. Im M. Quadriceps war das LC3-II Level signifikant erhöht, jedoch lag der Marker p62/SQSTM1 nur leicht über dem Niveau der Kontrollen. Die mTOR Aktivität war ebenfalls leicht erhöht, die AMPK α Aktivität leicht verringert.

Angesichts der insulinvermittelten Hemmung des Proteinabbaus wäre im insulinopenen Zustand eigentlich eine erhöhte Proteinabbaurate zu erwarten gewesen (Meijer et al., 2007). Die nachgewiesene (nicht signifikante) p62/SQSTM1 und (signifikante) LC3-II Akkumulation im M. Psoas spricht jedoch nicht für eine erhöhte Autophagie Aktivität, da sich in Studien nach einer chemischen Autophagie Stimulation durch Metformin keine Akkumulation, sondern eine drastische Verringerung der ATG's verzeichnen lassen.

Vor diesem Hintergrund könnte die Akkumulation der ATG's als Folge einer möglichen Blockade oder Überlastung des Autophagolysosomen-Systems durch die Auswirkung des T1DM interpretiert werden, was auch durch die tendentiell erhöhte Aktivität der inhibitorischen Regulatorkinase mTOR sowie die tendentiell verminderte Aktivität der Autophagie aktivierenden Regulatorkinase AMPK α gestützt wird. Da die Autophagie einen dynamischen Prozess darstellt, kann deren Untersuchung zu einem bestimmten Zeitpunkt wie in dieser Studie nur schwer eine Aussage über die zeitliche Veränderungen geben. Daher stellt die hier dargestellte Konstellation der Marker nur eine Momentaufnahme dar. Klar ist, dass die diabetische Erkrankung jedoch bezüglich des Krankheitsverlaufs in eine akute und eine chronische Phase unterteilt werden kann, in der auch die Gesamtproteolyse unterschiedlich verläuft. In der Akutphase kommt es häufig zu einer starken Zunahme der Gesamtproteolyse, in der chronischen Phase zu einer Abnahme (Pepato et al., 1996). Möglicherweise lassen sich die Auswirkungen des T1DM auf die Autophagie daher in verschiedene Phasen unterteilen, wonach eine anfängliche Hochregulation der Autophagie zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden zellulären Homöostase in der Frühphase der T1DM-Manifestation letztlich nach einer Überschreitung der autophagolysosomen Kapazität in einer Überlastung und Herunterregulation des Systems resultiert.

Darüber hinaus weist eine kürzlich veröffentlichte Studie von Muralidharan et al. (2020) auf eine mögliche direkte Autophagie Hemmung durch eine insulinunabhängig

vermittelte lysosomale Dysfunktion in Typ-1 diabetischen pankreatischen Betazellen in NOD Mäusen hin. Womöglich unterstützen solche Signalwege auch im Skelettmuskel zusätzlich die direkte Hemmung der Autophagie.

4.3.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Autophagolysosomale-System (ALS) und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) sind interagierende und zur gegenseitigen Regulation befähigte proteolytische Systeme (Wang et al., 2013). Im Skelettmuskel der Ratte macht der Proteinabbau über das UPS etwa 50% der gesamten Proteolyse im Skelettmuskel aus, während der Autophagie Anteil zwischen 25 und 30% beträgt (Sala et al., 2015; Wing et al., 1993). Man geht davon aus, dass das UPS maßgeblich zum diabetogen bedingten Proteinverlust im Skelettmuskel beiträgt (Liu et al., 2000).

Im STZ Gewebe des M. Psoas (T1DM) war die Chymotrypsin und Trypsin-Aktivität signifikant erhöht, während sich im M. Quadriceps nur eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der beiden Aktivitäten zeigte. Dies entspricht der aktuellen Studienlage, in der ebenfalls über eine erhöhte proteasomale Aktivität in Muskelgewebe aus Streptozotizin diabetischen Ratten berichtet wurde (Merforth et al., 1999; Mitch et al., 1996; Pepato et al., 1996; Price et al., 1996).

Aufgrund der Interaktionsmöglichkeiten beider Systemen könnte die Erhöhung der proteasomalen Aktivität als Kompensationsversuch für den Verlust des ausgelasteten Autophagolysosomalen-Systems im Typ-1 diabetischen Skelettmuskel interpretiert werden (Wang et al., 2013). Darüber hinaus ist bekannt, dass allein die Typ-1 diabetische Stoffwechsellage über zelluläre Signalwege zu einer Stimulation des UPS führt. Eine wichtige Rolle nehmen hierbei die im Skelettmuskel exprimierten *Forkhead-Box-O* Transkriptionsfaktoren FoxO1, FoxO3 und FoxO4 ein. Sie werden durch Insulinmangel aktiviert und stimulieren die Proteolyse (Sala et al., 2015). Insbesondere FoxO3 exprimiert muskelspezifische E3-Ubiquitin-Ligasen (MuRF1 und Atrogin 1), die am Proteinabbau über das UPS beteiligt sind, sowie verschiedene Proteasomuntereinheiten (Zhao et al., 2007). Außerdem ist FoxO3 für die Induktion mehrerer an der Autophagie beteiligter Gene verantwortlich (Sala et al., 2015). Die Hochregulation dieser Transkriptionsfaktoren könnte im ALS möglicherweise zu der beobachteten Kapazitätsauslastung beigetragen haben.

Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor ist der Einfluss des Hormons Cortisol. Die zirkulierenden Blutspiegel dieses Hormons sind bei Typ-1-Diabetikern häufig erhöht

(Chan et al., 2003). Studien haben gezeigt, dass sich eine erhöhte proteasomale Abbaurate speziell bei Typ-1 Diabetes durch den Einfluss von Glukokortikoiden einstellt (Pepato et al., 1996; Wing et al., 1993).

4.4 Effekte des T2DM auf die Protein-Qualitäts-Kontrolle

4.4.1 Das Autophagolysosomale-System

Im Typ-2 Diabetes Modell wurden drei verschiedene, jeweils 40 Wochen alte Gruppen von Ratten untersucht. Gesunde Kontrollratten wurden mit Placebo behandelten und Enalapril behandelten ZSF1 Ratten verglichen. ZSF1 Ratten entwickeln einen T2DM durch eine Mutation im Leptin Rezeptor Gen und stellen eine Kreuzung zwischen nicht hypertensiven weiblichen diabetischen Ratten (ZDF = *zucker diabetic fatty rat*) mit hypertensiven und für Herzinsuffizienz anfälligen männlichen Ratten (SHHF = *spontaneously hypertensive heart failure*) dar. Enalapril ist ein gängiges bei Herzinsuffizienz und Hypertonie eingesetztes Medikament und soll einen Vergleich zu Herzinsuffizienz therapierten ZSF1 Ratten ermöglichen.

Im M. Psoas präsentierten sich nur insignifikant erhöhte LC3-II Gesamtlevel für beide ZSF1 Gruppen. Außerdem war im Vergleich zu Kontrollen die LC3-II/I Ratio insignifikant vermindert. Die p62/SQSTM1 Level waren für beide Gruppen ebenfalls reduziert. Auch die mTOR Aktivität zeigte sich tendenziell vermindert, die AMPKα Aktivität war jedoch in der Enalapril-ZSF1 Gruppe (nicht signifikant) erhöht. Diese unwesentlichen Veränderungen der Proteinlevel weisen darauf hin, dass T2DM keine ausschlaggebenden Veränderungen im ALS hervorruft. Einerseits könnten die Ergebnisse durch eine verminderte Aktivität der Autophagie erklärt werden. Andererseits könnten verminderte LC3-II und p62/ SQSTM1 Level in Verbindung mit einer erhöhten AMPKα Aktivität ebenso als Folge eines gesteigerten Verbrauchs durch eine erhöhte Autophagie Aktivität gebründet werden.

Im M. Quadriceps ergeben sich für beide ZSF1-Gruppen ähnliche Trends. Insgesamt zeigte sich eine insignifikant verminderte LC3-II/I Ratio sowie unveränderte p62/ SQSTM1 Proteinlevel und mTOR / AMPKα Aktivitäten. Der Einfluss von T2DM auf den Quadricepsmuskel im Vergleich zum Psoasmuskel scheint analog zum T1DM Modell geringer zu sein.

Die Insulinresistenz ist bei Typ-2 Diabetikern nicht nur Folge der chronischen Hyperglykämie sondern stellt vielmehr eine wichtige zelluläre Verteidigung gegen die Erkrankung dar. Die chronische Hyperglykämie führt durch die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion zu einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was schließlich zur Entwicklung einer Insulinresistenz beiträgt (Gonzalez et al., 2011; Meijer et al., 2007). Die Insulinresistenz kann somit als wichtiger Abwehrmechanismus für insulinsensitive Zellen im diabetischen Zustand verstanden werden. Sie ermöglicht den Ablauf der autophagischen Proteolyse, schützt so die Zelle vor dem Zelltod und verzögert sogar das Fortschreiten des Diabetes (Meijer, 2007).

Der aktuellen Studienlage ist zu entnehmen, dass die Proteinhomöostase im Typ-2 diabetischen Muskelgewebe weitestgehend unbeeinflusst abläuft (Sala et al., 2016). Man geht dabei von einem adaptiven Mechanismus aus, der den Erhalt der Skelettmuskelmasse ermöglicht (Kruse et al., 2015). Dieser Mechanismus ist bisher jedoch noch nicht ausreichend untersucht worden und die Faktoren, die an dieser Anpassung beteiligt sind, sind unklar. Die hier dargestellten Ergebnisse zur Veränderung der Protein-Qualitäts-Kontrolle im Skelettmuskel im T2DM Modell stimmen mit der aktuellen Studienlage überein, da nur unwesentliche Veränderungen in der Autophagie Aktivität zu verzeichnen sind.

Zuletzt könnte das Alter der ZSF1-Ratten eine ausschlaggebende Rolle spielen. Möglicherweise finden wesentliche Veränderungen im Skelettmuskel vor oder nach dem Lebensalter von 40 Wochen statt.

4.4.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Im Typ-2 Diabetes Modell waren die untersuchten proteasomalen Aktivitäten der Placebo behandelten ZSF1 Ratten im M. Psoas signifikant erhöht, die Enalapril behandelten bewegten sich auf Kontrolllevel. Im M. Quadriceps war die Chymotrypsin Aktivität in beiden ZSF1 Gruppen insignifikant leicht erhöht, die Trypsin Aktivität zeigte keinen Unterschied zu Kontrollen.

Die Placebo-behandelten Ratten sind im Vergleich zu den Enalapril-behandelten anfälliger für eine Arterielle Hypertonie und Herzinsuffizienz. Aktuelle Studien geben Hinweise auf eine Beteiligung des UPS bei der Blutdruckregulation durch Einflussnahme auf den Natriumrücktransport in der Niere und die Veränderung der Gefäßenge durch die Modulation der Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit (Yamazaki et al., 2020). Über E3 Ligasen moduliert das UPS die Verfügbarkeit verschiedener renaler

Natrium Kanäle und beeinflusst so die Wasserrückresorption über die Niere. Ein essentieller Kofaktor für die Stickstoffmonoxid abhängige Verengung von Gefäßen ist Tetrahydrobiopterin (BH4) (Thöny et al., 2000). Das geschwindigkeitbestimmende Enzym GTP-Cyclohydrolase (GTPCH) ist an BH4-Synthese beteiligt und wird ebenfalls durch das UPS reguliert (Yamazaki et al., 2020). Möglicherweise steht das erhöhte kardiovaskuläre Erkrankungsbild der Placebo-behandelten ZSF1 Ratten im M. Psoas in direkter klinischer Verbindung mit einer erhöhten proteasomalen Aktivität. Sie könnte daher als Versuch der Blutdruckregulation interpretiert werden.

4.5 Klinischer Bezug

4.5.1 Kontrolle der Muskelmasse bei T1DM und T2DM

Hinsichtlich der Auswirkungen von Diabetes auf die Skelettmuskelmasse zeigen Typ-1 und Typ-2 Diabetiker deutliche klinische Unterschiede. Typ-1 Diabetiker leiden ohne antidiabetische Therapie oft unter einem dramatischen Muskelschwund (Krause et al., 2011), während insulinresistente Typ-2 Diabetiker im Vergleich zu gesunden Kontrollen meist keine Veränderung des Gesamtproteinumsatzes oder des Muskelverlusts vorweisen (Sala et al., 2015). Der bei Typ-1 Diabetikern beobachtete Muskelschwund könnte als Folge der insulinopen bedingten gesteigerten Proteolyse und der damit verbundenen fehlenden antikatabolen Wirkung des Hormons gewertet werden (Nair et al., 1983; Pepato et al., 1996).

Erstaunlicherweise ist die Muskelfunktion und -leistung von Typ-2 Diabetikern trotz Erhalt der Muskelmasse kompromittiert (Park et al., 2006). Es ist noch nicht ausreichend untersucht, welche Mechanismen dabei zum Erhalt der Muskelmasse beitragen. Möglicherweise kann durch die vorhandene Insulinrestkapazität eine ausreichende Proteinsynthese gewährleistet werden. Der Verlust der Muskelfunktion hingegen konnte dabei direkt mit der oft mehrjährigen Erkrankungsdauer des Diabetes in Verbindung gebracht werden, durch die eine Anpassung der Muskelautophagie an die Hyperglykämie ermöglicht wird (de Rekeneire et al., 2003). Hierbei könnten Veränderungen auf zellulärer Ebene eine Rolle spielen, die zwar nicht zum Verlust aber zur Funktionseinschränkung der Sarkomere führen. Weitere Faktoren die zum Verlust von Muskelfunktion und -kraft beitragen sind einerseits der Nachweis einer erhöhten Fettinfiltration in Typ-2 diabetischem Muskelgewebe und andererseits das Fortschreiten der diabetisch bedingten peripheren Polyneuropathie (Hilton et al., 2008).

4.6 Titin

4.6.1 K63 Ubiquitinierung und Titin Turnover

Titin ist aufgrund seiner Größe sehr anfällig für die Degradation unter pathologischen Stoffwechselzuständen (Hein et al., 1994). Ein vermehrter Abbau führt dabei zu einem erhöhten Auftreten des Titin Degradationsprodukt (T2). Vorangegangene Studien deuten auf eine Beteiligung der Autophagie und des proteasomalen Abbaus von Titin hin. Beispielsweise interagieren muskelspezifische E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MuRF-2 mit bestimmten Domänen des Titinfilaments (Witt et al., 2005). Außerdem besteht über die Interaktion zwischen dem p62/SQSTM1-Nbr1-Komplex und der Titin-Kinase-Domäne eine direkte Verbindung zum ALS (Lange, 2005). Über welches proteolytische System Titin jedoch hauptsächlich abgebaut wird ist Gegenstand aktueller Forschung. Da die muskuläre Proteindegradation grundsätzlich durch die Insulinresistenz und Insulinopenie beeinflusst wird ist anzunehmen, dass es im diabetischen Muskel möglicherweise auch zu einem veränderten Abbau des Titinfilaments kommen könnte. Zur näheren Untersuchung der Beteiligung beider proteolytischer Systeme am Titinumsatz wurde die K63 und K48 abhängige Ubiquitinierung des Titins und der Titin Turnover untersucht.

In der vorliegenden Studie konnte weder im T1DM noch im T2DM Modell ein signifikanter Unterschied bezüglich der K63 abhängigen Titin-Ubiquitinierung festgestellt werden. Im M. Psoas der STZ Ratten wurde lediglich eine insignifikant erhöhte T2/T1 Ratio beobachtet. In den übrigen Geweben war die T2/T1 Ratio insignifikant leicht vermindert.

Die Interpretation der T2/T1 Ratio ist generell nicht eindeutig festzulegen. Eine verringerte Ratio kann einerseits durch eine erhöhte Sarkomerstabilität mit reduziertem Titinumsatz erklärt werden. Andererseits kann sie aber ebenso auch das Ergebnis einer erhöhten Umsatzrate sein, die zur sofortigen Verarbeitung des T2-Fragments führt (Krüger et al., 2016). Eine erhöhte Ratio kann ebenfalls auf eine gestiegene Umsatzrate hinweisen, bei der die Verarbeitung des T2-Fragments jedoch verzögert abläuft. Zusammengefasst deutet das vermehrte Auftreten der T2-Degradationsbande im M. Psoas der STZ Ratten (T1DM Modell) am ehesten auf eine verringerte Titinstabilität und einen damit verbundenen erhöhten Titinumsatz hin.

Die unveränderten K63-Ubiquitinierungslevel im M. Psoas des STZ Gewebes könnten darauf hinweisen, dass die Degradation des Titinfilaments bei Auslastung des ALS möglicherweise auch über das UPS oder einen anderen proteolytischen Weg erfolgen könnte. Darüber hinaus ist zu beachten, dass ubiquitinierte Proteine schon unter basalen Bedingungen schnell prozessiert und abgebaut werden, sodass der Nachweis solcher Proteine oder deren Akkumulation zu einem bestimmten Zeitpunkt mittels Westernblot Analysen erschwert sein kann (Kötter et al., 2016). Die übrigen Ergebnisse im M. Quadriceps der STZ Ratten sowie im gesamten T2DM könnten auf einen weniger stark ausgeprägten Stabilitätsverlust und Abbau des Titinfilaments hinweisen.

4.6.2 K48 Ubiquitinierung und Titin Turnover

Die Untersuchung der proteasomalen Aktivität zeigte insbesondere im STZ Gewebe eine erhöhte Aktivität. Sie wurde als Versuch interpretiert, die Auslastung des ALS zu kompensieren. Um über das UPS abgebaut zu werden muss das Titinfilament zunächst durch eine K48-abhängige Polyubiquitinierung markiert werden. Das *full-length* Titin K48-Ubiquitinierungslevel zeigte in beiden Diabetesmodellen (außer im STZ Gewebe des M. Psoas) eine leichte (nicht signifikante) Verringerung. Grundsätzlich könnte die Verringerung des K48-ubiquitinierten Titins in Verbindung mit einer erhöhten proteasomalen Aktivität und einer verringerten T2/T1 Ratio für einen erhöhten Titinumsatz und sofortigen Abbau des Titinfilaments über das UPS sprechen. Die leicht erhöhte K48-Ubiquitinierung im STZ Gewebe des M. Psoas im T1DM Modell hingegen könnte in Verbindung mit der erhöhten T2/T1 Ratio auf einen verzögerten Abbau des Titinfilaments über das Proteasom hindeuten. Dies entspricht Studien die nachgewiesen haben, dass durch die Hemmung der Autophagie auch der proteasomale Abbau beeinträchtigt sein kann und dadurch ubiquitinierte Substrate akkumulieren können (Matsumoto et al., 2011).

4.7 Vergleich der Muskelgewebe

In der vorliegende Studie wurden zwei verschiedene Muskelgewebe untersucht. Im M. Psoas zeigten sich im Vergleich zum M. Quadriceps deutlichere Veränderungen. Es ist daher anzunehmen, dass auch die Muskelfaserart und -funktion einen Einfluss auf Stoffwechselvorgänge haben.

Der aktuellen Studienlage ist nicht klar zu entnehmen, welche Faserart beim Menschen und der Ratte hauptsächlich im M. Psoas existiert, da sich die fasertypische Zusammensetzung in Bezug auf seinen segmentalen Ursprung ändert (Havenith et al., 1990; Johnson et al., 1973; Kimura, 2002; Zheng et al., 1992). Beim Menschen nimmt der kraniale Anteil eine primär posturale Funktion ein, während der kaudale Teil des Muskels eine dynamische Funktion einnimmt (Arbanas et al., 2009). Eine Reihe von Studien berichten von einem sehr hohen Prozentsatz (größer 40%) oder sogar einem Überwiegen von langsamen Typ-I Muskelfasern im menschlichen Psoasmuskel, was seine posturale Rolle unterstreicht (Arbanas et al., 2009; Havenith et al., 1990; Johnson et al., 1973; Kimura, 2002; Zheng et al., 1992).

Der Psoasmuskel der Ratte wird allgemein als schneller Muskel angesehen (Vlahovic et al., 2017). Er besteht laut Studienlage vorwiegend aus Typ IIb glykolytischen Muskelfasern und aus einem geringen Prozentsatz langsamer Typ I Muskelfasern (Edström et al., 1982; Hämäläinen et al., 1993). Die faserartige Zusammensetzung stellt sich hier im Vergleich zum menschlichen Psoas Muskel umgekehrt dar. In kranio-caudaler Richtung wechselt die Funktion von einer lokomotorischen zu einer posturalen (Vlahovic et al., 2017; Wang et al., 2000).

Im M. Quadriceps der Ratte findet laut Studienlage eine Regionalisierung der Muskelfasern statt, da tiefe und proximale Muskelregionen über signifikant höhere Typ I Fasern verfügen als oberflächliche und distale Regionen, in denen eher schnellere Typ IIb und IIx Fasern vertreten sind (Kohn et al., 2007). Grundsätzlich geht man bezüglich der MHC-Isoformen Verteilung des humanen Quadricepsmuskels auch von einer gemischten Faserverteilung aus, hauptsächlich jedoch mit Typ-I Fasern (Edgerton et al., 1975; Staron et al., 1997).

Verschiedene Ursachen kommen für die im Vergleich zum M. Quadriceps erhöhte metabolische Reaktion im M. Psoas in Betracht. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen der dominierenden Verteilung von schnellen glykolytischen Typ-II Muskelfasern im M. Psoas der Ratte und den Veränderungen der Protein Qualitäts-Kontrolle in Abhängigkeit von Diabetes Mellitus. Studien zeigen, dass die Kapazität der Glukoseaufnahme in oxidativen Typ-I Muskelfasern höher ist als in glykolytischen Typ-II Muskelfasern (Bonen et al., 1981). Durch die verminderte Glukose Verarbeitungskapazität könnten Typ-II Fasern anfälliger für insulinbedingte Stoffwechselstörungen sein (Albers et al., 2015). Außerdem wurden in verschiedenen Studien erhöhte UPS Aktivitäten in vorwiegend schnell zuckenden Typ-II Muskelfasern

STZ diabetischer Ratten gemessen, während die Zunahme in langsam zuckenden Fasern nur gering war (Pepato et al., 1996; Price et al., 1996). In einer weiteren Studie wurde dargestellt, dass typischerweise schnell zuckende glykolytische Typ-II Fasern die schwersten Atrophien unter T1DM vorweisen (Krause et al., 2011). Als Grund dafür wurde eine Überladung mit glykierten Proteinen (*Advanced Glycation End Products*) vorgeschlagen, da sich diese in der Studie insbesondere in Typ II Muskelfasern nachweisen ließen. Zuletzt ergaben sich zudem Hinweise für eine verringerte AKT-Expression im glykolytischen Muskel im Vergleich zum oxidativen Muskel (Ekladous et al., 2008). Dies könnte auf zellulärer Ebene eine Induktion der FoxO's und nachfolgend eine Aktivierung der proteolytischen Signalwege hervorrufen.

Der M. Quadriceps ist aufgrund der Regionalisierung der Muskelfasern möglicherweise weniger anfällig für insulinbedingte Stoffwechselstörungen. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die genaue Entnahmestelle der Muskelgewebeprobe eine wichtige Rolle spielt, da die Faserzusammensetzung je nach Entnahmestelle variiert. Die für diese Studie verwendeten Proben bestanden jeweils aus vollständigen Quadricepsmuskeln, sodass die Entnahmestelle stets an unterschiedlichen Stellen vorgenommen wurde.

Neben der Korrelation zwischen der muskulären Funktion und den MHC Isoformen geht man davon aus, dass auch die Größe regulatorischer Sarkomerproteine von der MHC Isoforme und damit dem Muskeltyp abhängig ist (O'Connell et al., 2004). Es ist bekannt, dass schnelle Muskeln eine kurze und steife Titin Isoform exprimieren, wohingegen in langsamen Muskeln eine lange und nachgiebige Titin Isoform vorherrscht (Prado et al., 2005). Auch im M. Psoas, der überwiegend schnelle Fasern enthält, wurde ein kurzes Titinfilament nachgewiesen (Freiburg et al., 2000). Die Größenvariabilität der Skelettmuskel-Titinisoformen impliziert ein Potential für Veränderungen der Titingröße in Krankheitszuständen, die sich dann auf die passive Muskelsteifheit auswirken könnten (Prado et al., 2005). In beiden hier untersuchten Diabetesmodellen konnte im Größenvergleich der Skelettmuskeltitine jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.8 Zusammenfassung & Ausblick

Diabetes Mellitus ist eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen und stellt ein globales Gesundheitsproblem dar. Die wichtigsten Haupttypen, T1DM und T2DM, unterscheiden sich in ihrer Pathophysiologie und Klinik. Im Bezug zum Skelettmuskel stellt besonders der Erhalt von Muskelmasse und Funktionalität einen wichtigen Unterschied zwischen beiden Entitäten dar. Der Zustand einer chronischen Hyperglykämie ist bei beiden Diabetes Typen die Folge einer unzureichenden Glukosehomöostase und führt zu wesentlichen Auswirkungen auf den Proteinstoffwechsel innerhalb der Skelettmuskulatur, was in dieser Studie dargestellt werden konnte. Hierbei unterscheiden sich die Effekte je nach Diabetesform deutlich voneinander.

Es konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass T1DM muskelspezifisch zu einer Überlastung des Autophagolysosomalen-Systems mit folgender Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems führt. Dieser Vorgang scheint in Typ-II faserdominanten glykolytisch verstoffwechselnden Muskeln wie dem M. Psoas stärker ausgeprägt zu sein als in Typ-I faserdominanten oxidativen Muskeln wie dem M. Quadriceps. Hierbei spielt außerdem der Zeitpunkt der Untersuchung eine wichtige Rolle, da die sich der Vorgang der Proteolyse je nach Zeitpunkt der Diabetesmanifestation mutmaßlich ändert und einer stetigen Dynamik unterliegt. Die weitestgehend unveränderte Protein-Qualitäts-Kontrolle im T2DM Modell wird möglicherweise durch eine Adaptation auf die chronische Hyperglykämie und Insulinresistenz ermöglicht. Neben diversen negativen Auswirkungen der Insulinresistenz auf den Organismus kann diese jedoch auch als wichtiger Schutzmechanismus vor einer Akkumulation von zelltoxischen Radikalen im Typ-II diabetischen Skelettmuskel verstanden werden. Dies spiegelt sich zudem klinisch wieder, da T2DM Patientin im Vergleich zu T1DM Patientin über mehr Muskelmasse verfügen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die Hochregulation des proteasomalen Abbaus über das UPS einen wichtigen Einfluss auf die Blutdruckregulation in Placebo behandelten ZSF1 Ratten unter Typ-2 diabetischen Bedingungen hat.

Da eine Beteiligung der Autophagie und des UPS am Titinabbau angenommen werden und deren Aktivität nachweislich unter dem Einfluss von T1DM und T2DM stehen, wird auch die Stabilität des sarkomerischen Proteins Titin von einer langanhaltenden diabetischen Stoffwechsellage beeinflusst. Die vorliegende Studie gibt Hinweise auf einen erhöhten Titin Turnover im Typ-I diabetischen M. Psoas. Dies könnte darauf

hinweisen, dass die durch den Muskelschwund reduzierte Anzahl verbliebener Sarkomere einem erhöhten mechanischen Stress ausgesetzt sind und es dadurch zu einer schnelleren Abnutzung kommt. Im Typ-2 diabetischen Muskel konnte keine Änderung dargestellt werden. Zudem konnte keine signifikante Änderung der K63- sowie K48 abhängigen Ubiquitinierung erhoben werden. Möglich ist, dass die Degradation des Titinfilaments bei Auslastung des ALS vermehrt über das UPS oder andere proteolytische Wege erfolgt. Im M. Psoas des T1DM Modells deuten die Ergebnisse auf eine durch die Überlastung der Autophagie hervorgerufene Verzögerung des proteasomalen Abbaus hin. Der Nachweis einer Akkumulation solcher Proteine mittels Westernblot Analysen stellt generell eine Herausforderung dar und sollte in Folgestudien durch alternative Methode untersucht werden.

Grundsätzlich sollte die hier geprüfte Fragestellung zum Vergleich an jüngere ZSF1 Ratten untersucht werden, da sich Veränderungen in der Protein-Qualitäts-Kontrolle eventuell zu einem früherem Zeitpunkt darstellen und der Übergang zwischen Kompensation und Dekompensation einer stetigen Dynamik unterliegt. Darüber hinaus ist zu beachten, dass es sich bei den hier verwendeten Methoden um Tiermodelle handelt, die das humane Krankheitsbild nicht vollständig nachbilden können.

5 LITERATUR- UND QUELLEN- VERZEICHNIS

Agarkova, I., Perriard, J.-C., 2005. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends in Cell Biology* 15, 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.001>

Albers, P.H., Pedersen, A.J.T., Birk, J.B., Kristensen, D.E., Vind, B.F., Baba, O., Nøhr, J., Højlund, K., Wojtaszewski, J.F.P., 2015. Human Muscle Fiber Type–Specific Insulin Signaling: Impact of Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 64, 485–497. <https://doi.org/10.2337/db14-0590>

American Diabetes Association, 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33 Suppl 1, S62–69. <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>

Andersen, J.L., Schiaffino, S., 1997. Mismatch between myosin heavy chain mRNA and protein distribution in human skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 272, C1881–C1889. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.6.C1881>

Arbanas, J., Starcevic Klasan, G., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01155.x>

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 ≈ 700 -kDa Titin Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System. *Circulation Research* 89, 1065–1072. <https://doi.org/10.1161/hh2301.100981>

Bao, X., Ren, T., Huang, Y., Ren, C., Yang, K., Zhang, H., Guo, W., 2017. Bortezomib induces apoptosis and suppresses cell growth and metastasis by inactivation of Stat3 signaling in chondrosarcoma. *Int J Oncol* 50, 477–486. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3806>

Bento, C.F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C., 2016. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* 85, 685–713. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014556>

- Biolo, G., Declan Fleming, R.Y., Wolfe, R.R., 1995. Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 95, 811–819. <https://doi.org/10.1172/JCI117731>
- Bonen, A., Tan, M.H., Watson-Wright, W.M., 1981. Insulin Binding and Glucose Uptake Differences in Rodent Skeletal Muscles. *Diabetes* 30, 702–704. <https://doi.org/10.2337/diab.30.8.702>
- Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C.R., 2014. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a009191–a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Boyd-Clark, L.C., Briggs, C.A., Galea, M.P., 2001. Comparative histochemical composition of muscle fibres in a pre- and a postvertebral muscle of the cervical spine. *Journal of Anatomy* 199, 709–716. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19960709.x>
- Chan, E.Y., 2012. Regulation and Function of Uncoordinated-51 Like Kinase Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling* 17, 775–785. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4396>
- Chan, O., Inouye, K., Riddell, M.C., Vranic, M., Matthews, S.G., 2003. Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva Endocrinol* 28, 87–102.
- Ciechanover, A., Schwartz, A.L., 1989. How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system. *Trends in Biochemical Sciences* 14, 483–488. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90180-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90180-1)
- de Rekeneire, N., Resnick, H.E., Schwartz, A.V., Shorr, R.I., Kuller, L.H., Simonsick, E.M., Vellas, B., Harris, T.B., 2003. Diabetes Is Associated With Subclinical Functional Limitation in Nondisabled Older Individuals: The Health, Aging, and Body Composition study. *Diabetes Care* 26, 3257–3263. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.12.3257>
- De Santi, M., Baldelli, G., Diotallevi, A., Galluzzi, L., Schiavano, G.F., Brandi, G., 2019. Metformin prevents cell tumorigenesis through autophagy-related cell death. *Sci Rep* 9, 66. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37247-6>
- DeFronzo, R.A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., Felber, J.P., 1981. The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose: Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization. *Diabetes* 30, 1000–1007. <https://doi.org/10.2337/diab.30.12.1000>

- D'Souza, D.M., Al-Sajee, D., Hawke, T.J., 2013. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front. Physiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00379>
- Edgerton, V.R., Smith, J.L., Simpson, D.R., 1975. Muscle fibre type populations of human leg muscles. *Histochem J* 7, 259–266. <https://doi.org/10.1007/BF01003594>
- Edström, L., Hultman, E., Sahlin, K., Sjöholm, H., 1982. The contents of high-energy phosphates in different fibre types in skeletal muscles from rat, guinea-pig and man. *The Journal of Physiology* 332, 47–58. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014399>
- Egan, D., Kim, J., Shaw, R.J., Guan, K.-L., 2011. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 7, 643–644. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15123>
- Ehrlicher, S.E., Stierwalt, H.D., Newsom, S.A., Robinson, M.M., 2018. Skeletal muscle autophagy remains responsive to hyperinsulinemia and hyperglycemia at higher plasma insulin concentrations in insulin-resistant mice. *Physiol Rep* 6, e13810. <https://doi.org/10.14814/phy2.13810>
- Ekladous, D., Mehdi, M.Z., Costa, M., Srivastava, A.K., Chiasson, J.-L., Coderre, L., 2008. Tissue- and fibre-specific modifications of insulin-signalling molecules in cardiac and skeletal muscle of diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35, 971–978. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04944.x>
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D.J., 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24, 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>
- Finley, D., 2009. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477–513. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607>
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougereousse, 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. *Circulation Research* 86, 1114–1121. <https://doi.org/10.1161/01.RES.86.11.1114>
- 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. *Journal of Cell Biology* 106, 1563–1572. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.5.1563>

Gallastegui, N., Groll, M., 2010. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.005>

Goldstein, B.J., 2002. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology* 90, 3–10. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02553-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02553-5)

Gonzalez, C.D., Lee, M.-S., Marchetti, P., Pietropaolo, M., Towns, R., Vaccaro, M.I., Watada, H., Wiley, J.W., 2011. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* 7, 2–11. <https://doi.org/10.4161/auto.7.1.13044>

Gregorio, C.C., Trombitás, 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. *Journal of Cell Biology* 143, 1013–1027. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.4.1013>

Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T., Huber, R., 2005. Molecular Machines for Protein Degradation. *ChemBioChem* 6, 222–256. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400313>

Guthrie, R.A., Guthrie, D.W., 2004. Pathophysiology of Diabetes Mellitus: Critical Care Nursing Quarterly 27, 113–125. <https://doi.org/10.1097/00002727-200404000-00003>

Hale, A.N., Ledbetter, D.J., Gawriluk, T.R., Rucker, III, E.B., 2013. Autophagy: Regulation and role in development. *Autophagy* 9, 951–972. <https://doi.org/10.4161/auto.24273>

Hämäläinen, N., Pette, D., 1993. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histochem Cytochem.* 41, 733–743. <https://doi.org/10.1177/41.5.8468455>

Hamdani, N., Krysiak, J., Kreusser, M.M., Neef, S., dos Remedios, C.G., Maier, L.S., Krüger, 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, 664–674. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300105>

- Harreiter, J., Roden, M., 2019. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2019). *Wien Klin Wochenschr* 131, 6–15. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1450-4>
- Havenith, M.G., Visser, R., Schendel, J.M.C.S., Bosman, F.T., 1990. Muscle fiber typing in routinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies. *Histochemistry* 93, 497–499. <https://doi.org/10.1007/BF00266407>
- Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., Labeit, D., Labeit, S., Sorimachi, H., 2008. Multiple Molecular Interactions Implicate the Connectin/Titin N2A Region as a Modulating Scaffold for p94/Calpain 3 Activity in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 283, 14801–14814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708262200>
- Hein, S., Scholz, D., Fujitani, N., Rennollet, H., Brand, T., Friedl, A., Schaper, J., 1994. Altered Expression of Titin and Contractile Proteins in Failing Human Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26, 1291–1306. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1994.1148>
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Hilton, T.N., Tuttle, L.J., Bohnert, K.L., Mueller, M.J., Sinacore, D.R., 2008. Excessive Adipose Tissue Infiltration in Skeletal Muscle in Individuals With Obesity, Diabetes Mellitus, and Peripheral Neuropathy: Association With Performance and Function. *Physical Therapy* 88, 1336–1344. <https://doi.org/10.2522/ptj.20080079>
- Hoffmann, Pratt, Rechsteiner, 1992. Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate.
- Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E., Podolsky, R.J., 1986. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* 323, 160–164. <https://doi.org/10.1038/323160a0>
- Horowitz, R., Maruyama, K., Podolsky, R.J., 1989. Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 109, 2169–2176. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.5.2169>
- Huxley, H., Hanson, J., 1954. Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature* 173, 973–976. <https://doi.org/10.1038/173973a0>

- Ji, Chang Hoon, Kwon, Yong Tae, 2017. Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Molecules and Cells* 40, 441–449. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2017.0115>
- Johnson, M.A., Polgar, J., Weightman, D., Appleton, D., 1973. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. *Journal of the Neurological Sciences* 18, 111–129. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(73\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-510X(73)90023-3)
- Ju, J.-S., Varadhachary, A.S., Miller, S.E., Weihl, C.C., 2010. Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle. *Autophagy* 6, 929–935. <https://doi.org/10.4161/auto.6.7.12785>
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., Kim, D.-H., 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters* 584, 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>
- Kahn, S.E., Cooper, M.E., Del Prato, S., 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet* 383, 1068–1083. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)
- Kimura, T., 2002. Composition of psoas major muscle fibers compared among humans, orangutans, and monkeys. *Z Morphol Anthropol* 83, 305–314.
- Knappeis, G.G., Carlsen, F., 1968. THE ULTRASTRUCTURE OF THE M LINE IN SKELETAL MUSCLE. *Journal of Cell Biology* 38, 202–211. <https://doi.org/10.1083/jcb.38.1.202>
- Kocaturk, N.M., Gozuacik, D., 2018. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 128. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00128>
- 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. *J Anatomy* 210, 8–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00661.x>
- Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C., 2009. Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Molecular Cell* 33, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.021>

- Kötter, S., Andresen, C., Krüger, M., 2014. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biological Chemistry* 395, 1341–1352. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0178>
- Kötter, S., Gout, L., Von Frieling-Salewsky, M., Müller, A.E., Helling, 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. *Cardiovascular Research* 99, 648–656. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt144>
- 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. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309685>
- Krause, M.P., Riddell, M.C., Hawke, T.J., 2011. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatric Diabetes* 12, 345–364. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2010.00699.x>
- Krüger, M., 2015. Posttranslational Modification of the Titin Springs: Dynamic Adaptation of Passive Sarcomere Stiffness, in: Ehler, E. (Ed.), *Cardiac Cytoarchitecture*. Springer International Publishing, Cham, pp. 109–124. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15263-9_6
- Krüger, M., Kötter, S., 2016. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front. Physiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00076>
- 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. *Circulation Research* 104, 87–94. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184408>
- Krüger, M., Linke, W.A., 2011. The Giant Protein Titin: A Regulatory Node That Integrates Myocyte Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 9905–9912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.173260>
- Kruse, R., Vind, B.F., Petersson, S.J., Kristensen, J.M., Højlund, K., 2015. Markers of autophagy are adapted to hyperglycaemia in skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetologia* 58, 2087–2095. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3654-0>

- Kuma, A., Mizushima, N., 2010. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: With an emphasis on nutrient metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.03.002>
- Labeit, S., Kolmerer, B., 1995. Titins: Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity. *Science* 270, 293–296. <https://doi.org/10.1126/science.270.5234.293>
- Lamark, T., Svenning, S., Johansen, T., 2017. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry* 61, 609–624. <https://doi.org/10.1042/EBC20170035>
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., Tooze, S.A., 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 759–774. <https://doi.org/10.1038/nrm3696>
- Lange, S., 2005. The Kinase Domain of Titin Controls Muscle Gene Expression and Protein Turnover. *Science* 308, 1599–1603. <https://doi.org/10.1126/science.11110463>
- Lange, S., Ehler, E., Gautel, M., 2006. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends in Cell Biology* 16, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.11.007>
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., Mitch, W.E., 2006. Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *JASN* 17, 1807–1819. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083>
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Li, H., Linke, W.A., Oberhauser, A.F., Carrion-Vazquez, M., Kerkvliet, J.G., Lu, H., Marszalek, P.E., Fernandez, J.M., 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* 418, 998–1002. <https://doi.org/10.1038/nature00938>
- Linke, W.A., Ivemeyer, M., Olivieri, N., Kolmerer, B., Rüegg, C.J., Labeit, S., 1996. Towards a Molecular Understanding of the Elasticity of Titin. *Journal of Molecular Biology* 261, 62–71. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0441>
- Linke, W.A., Krüger, M., 2010. The Giant Protein Titin as an Integrator of Myocyte Signaling Pathways. *Physiology* 25, 186–198. <https://doi.org/10.1152/physiol.00005.2010>
- Linke, W.A., Rudy, D.E., Centner, T., Gautel, M., Witt, C., Labeit, S., Gregorio, C.C., 1999. I-Band Titin in Cardiac Muscle Is a Three-Element Molecular Spring and Is Critical

- for Maintaining Thin Filament Structure. *Journal of Cell Biology* 146, 631–644. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.3.631>
- Liu, Z., Miers, W.R., Wei, L., Barrett, E.J., 2000. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway in Heart vs Skeletal Muscle: Effects of Acute Diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 1255–1260. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3609>
- Loos, B., Toit, A. du, Hofmeyr, J.-H.S., 2014. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy* 10, 2087–2096. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.973338>
- Mannion, A.F., Dumas, G.A., Cooper, R.G., Espinosa, F.J., Faris, M.W., Stevenson, J.M., 1997. Muscle fibre size and type distribution in thoracic and lumbar regions of erector spinae in healthy subjects without low back pain: normal values and sex differences. *J Anatomy* 190, 505–513. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19040505.x>
- Maruyama, K., 1994. Connectin, an elastic protein of striated muscle. *Biophysical Chemistry* 50, 73–85. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(94\)85021-6](https://doi.org/10.1016/0301-4622(94)85021-6)
- Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., Nukina, N., 2011. Serine 403 Phosphorylation of p62/SQSTM1 Regulates Selective Autophagic Clearance of Ubiquitinated Proteins. *Molecular Cell* 44, 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.039>
- Meijer, A.J., Codogno, P., 2007. Macroautophagy: Protector in the Diabetes Drama? *Autophagy* 3, 522–525. <https://doi.org/10.4161/auto.4449>
- Merforth, S., Osmer, A., Dahlmann, B., 1999. Alterations of proteasome activities in skeletal muscle tissue of diabetic rats. *Molecular Biology Reports* 26, 83–87. <https://doi.org/10.1023/A:1006966005662>
- Miller, M.K., Bang, M.-L., Witt, C.C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A.S., Gregorio, C.C., Labeit, S., 2003. The Muscle Ankyrin Repeat Proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a Family of Titin Filament-based Stress Response Molecules. *Journal of Molecular Biology* 333, 951–964. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.012>

- Mitch, W.E., Goldberg, A.L., 1996. Mechanisms of Muscle Wasting — The Role of the Ubiquitin–Proteasome Pathway. *N Engl J Med* 335, 1897–1905. <https://doi.org/10.1056/NEJM199612193352507>
- Munch, D., Rodriguez, E., Bressendorff, S., Park, O.K., Hofius, D., Petersen, M., 2014. Autophagy deficiency leads to accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, and cell death in *Arabidopsis*. *Autophagy* 10, 1579–1587. <https://doi.org/10.4161/auto.29406>
- Muralidharan, C., Conteh, A.M., Marasco, M.R., Crowder, J.J., Kuipers, J., de Boer, P., Giepmans, B.N.G., Linnemann, A.K., 2020. Pancreatic Beta Cell Autophagy is Impaired in Type 1 Diabetes (preprint). *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.10.291443>
- Nair, K.S., Garrow, J.S., Ford, C., Mahler, R.F., Halliday, D., 1983. Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man. *Diabetologia* 25, 400–403. <https://doi.org/10.1007/BF00282518>
- Naito, T., Kuma, A., Mizushima, N., 2013. Differential Contribution of Insulin and Amino Acids to the mTORC1–Autophagy Pathway in the Liver and Muscle. *J. Biol. Chem.* 288, 21074–21081. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456228>
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D., 2006. The ubiquitin–proteasome system. *J. Biosci.* 31, 137–155. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>
- 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. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 24, 175–189. <https://doi.org/10.1023/A:1026053530766>
- O’Connell, B., Nguyen, L.T., Stephenson, G.M.M., 2004. A single-fibre study of the relationship between MHC and TnC isoform composition in rat skeletal muscle. *Biochem J* 378, 269–274. <https://doi.org/10.1042/BJ20031170>
- Opitz, C.A., Leake, M.C., Makarenko, I., Benes, V., Linke, W.A., 2004. Developmentally Regulated Switching of Titin Size Alters Myofibrillar Stiffness in the Perinatal Heart. *Circulation Research* 94, 967–975. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000124301.48193.E1>
- Ouyang, C., You, J., Xie, Z., 2014. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 71, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.10.014>

- Park, S.W., Goodpaster, B.H., Strotmeyer, 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, 1813–1818. <https://doi.org/10.2337/db05-1183>
- Penning, L., 2000. Psoas muscle and lumbar spine stability: a concept uniting existing controversies. *European Spine Journal* 9, 577–585. <https://doi.org/10.1007/s005860000184>
- Pepato, M.T., Migliorini, R.H., Goldberg, A.L., Kettelhut, I.C., 1996. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 271, E340–E347. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.2.E340>
- Pickart, C.M., 2001. Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.503>
- Polonsky, K.S., 2012. The Past 200 Years in Diabetes. *N Engl J Med* 367, 1332–1340. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1110560>
- Prado, L.G., Makarenko, I., Andresen, C., Krüger, 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. *Journal of General Physiology* 126, 461–480. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509364>
- Price, S.R., Bailey, J.L., Wang, X., Jurkovitz, C., England, B.K., Ding, X., Phillips, L.S., Mitch, W.E., 1996. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J. Clin. Invest.* 98, 1703–1708. <https://doi.org/10.1172/JCI118968>
- Pyle, W.G., Solaro, R.J., 2004. At the Crossroads of Myocardial Signaling: The Role of Z-Discs in Intracellular Signaling and Cardiac Function. *Circulation Research* 94, 296–305. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000116143.74830.A9>
- Queisser, M.A., Yao, D., Geisler, S., Hammes, H.-P., Lochnit, G., Schleicher, E.D., Brownlee, M., Preissner, K.T., 2010. Hyperglycemia Impairs Proteasome Function by Methylglyoxal. *Diabetes* 59, 670–678. <https://doi.org/10.2337/db08-1565>
- Rizza, R.A., Mandarino, L.J., Gerich, J.E., 1981. Mechanisms of insulin resistance in man. *The American Journal of Medicine* 70, 169–176. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90423-X](https://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90423-X)

- Roden, M., 2016. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation und Diagnose. *Wien Klin Wochenschr* 128, 37–40. <https://doi.org/10.1007/s00508-015-0931-3>
- Rosenfalck, A.M., Almdal, T., Hilsted, J., Madsbad, S., 2002. Body composition in adults with Type 1 diabetes at onset and during the first year of insulin therapy: Original article. *Diabetic Medicine* 19, 417–423. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2002.00702.x>
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., Guan, K.-L., 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 15, 741–750. <https://doi.org/10.1038/ncb2757>
- Sala, D., Zorzano, A., 2016. Impact of Type 2 Diabetes on Skeletal Muscle Mass and Quality, in: *Molecular Nutrition and Diabetes*. Elsevier, pp. 73–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801585-8.00007-5>
- Sala, D., Zorzano, A., 2015. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3803–3817. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1954-7>
- Sandri, M., 2013. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 2121–2129. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.023>
- Sandri, M., 2010. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Letters* 584, 1411–1416. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.056>
- Schiaffino, S., Reggiani, C., 1994. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 77, 493–501. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493>
- Shibutani, S.T., Yoshimori, T., 2014. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res* 24, 58–68. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.159>
- Shintani, T., 2004. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* 306, 990–995. <https://doi.org/10.1126/science.1099993>
- Srinivasan, R.C., Lungren, M.P., Langenderfer, J.E., Hughes, R.E., 2007. Fiber type composition and maximum shortening velocity of muscles crossing the human shoulder. *Clin. Anat.* 20, 144–149. <https://doi.org/10.1002/ca.20349>
- Staron, R.S., 1997. Human Skeletal Muscle Fiber Types: Delineation, Development, and Distribution. *Can. J. Appl. Physiol.* 22, 307–327. <https://doi.org/10.1139/h97-020>

- Tan, J.M.M., Wong, E.S.P., Kirkpatrick, D.S., Pletnikova, O., Ko, H.S., Tay, S.-P., Ho, M.W.L., Troncoso, J., Gygi, S.P., Lee, M.K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Lim, K.-L., 2008. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics* 17, 431–439. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm320>
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., Kominami, E., 2005. Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy. *Autophagy* 1, 84–91. <https://doi.org/10.4161/auto.1.2.1697>
- Terzis, G., Georgiadis, G., Vassiliadou, E., Manta, P., 2003. Relationship between shot put performance and triceps brachii fiber type composition and power production. *Eur J Appl Physiol* 90, 10–15. <https://doi.org/10.1007/s00421-003-0847-x>
- Thöny, B., Auerbach, G., Blau, N., 2000. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 347 Pt 1, 1–16.
- Thrower, J.S., 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal* 19, 94–102. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.94>
- Tian, L.-F., Li, H.-Y., Jin, B.-F., Pan, X., Man, J.-H., Zhang, P.-J., Li, W.-H., Liang, B., Liu, H., Zhao, J., Gong, W.-L., Zhou, T., Zhang, X.-M., 2006. MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.108>
- Tönnies, T., Röckl, S., Hoyer, A., Heidemann, C., Baumert, J., Du, Y., Scheidt-Nave, C., Brinks, R., 2019. Projected number of people with diagnosed Type 2 diabetes in Germany in 2040. *Diabet. Med.* 36, 1217–1225. <https://doi.org/10.1111/dme.13902>
- Trombitás, 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. *Journal of Cell Biology* 140, 853–859. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.4.853>
- Tskhovrebova, L., Trinick, J., 2004. Properties of Titin Immunoglobulin and Fibronectin-3 Domains. *J. Biol. Chem.* 279, 46351–46354. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400023200>
- Tskhovrebova, L., Trinick, J., 2003. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 679–689. <https://doi.org/10.1038/nrm1198>

- Vlahovic, H., Bazdaric, K., Marijancic, V., Soic-Vranic, T., Malnar, D., Arbanas, J., 2017. Segmental fibre type composition of the rat iliopsoas muscle. *J. Anat.* 230, 542–548. <https://doi.org/10.1111/joa.12588>
- Wang, L.C., Kernell, D., 2000. Proximo-distal organization and fibre type regionalization in rat hindlimb muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 21, 587–598. <https://doi.org/10.1023/a:1026584307999>
- Wang, X.J., Yu, J., Wong, S.H., Cheng, A.S., Chan, F.K., Ng, S.S., Cho, C.H., Sung, J.J., Wu, W.K., 2013. A novel crosstalk between two major protein degradation systems: Regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy* 9, 1500–1508. <https://doi.org/10.4161/auto.25573>
- Williams, Newell, R., 2005. *Gray's Anatomy*. Elsevier, Churchill Livingstone.
- Wing, S.S., Goldberg, A.L., 1993. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 264, E668–E676. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.4.E668>
- Witt, S.H., Granzier, H., Witt, C.C., Labeit, S., 2005. MURF-1 and MURF-2 Target a Specific Subset of Myofibrillar Proteins Redundantly: Towards Understanding MURF-dependent Muscle Ubiquitination. *Journal of Molecular Biology* 350, 713–722. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.021>
- Wolfe, R.R., 2005. Regulation of skeletal muscle protein metabolism in catabolic states: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 8, 61–65. <https://doi.org/10.1097/00075197-200501000-00009>
- Workeneh, B., Bajaj, M., 2013. The regulation of muscle protein turnover in diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 2239–2244. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.028>
- Yamazaki, O., Hirohama, D., Ishizawa, K., Shibata, S., 2020. Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Regulation of Blood Pressure: A Review. *IJMS* 21, 5358. <https://doi.org/10.3390/ijms21155358>
- Yoshii, S.R., Mizushima, N., 2017. Monitoring and Measuring Autophagy. *IJMS* 18, 1865. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>
- Yoshio, M., Murakami, G., Sato, T., Sato, S., Noriyasu, S., 2002. The function of the psoas major muscle: passive kinetics and morphological studies using donated

cadavers. Journal of Orthopaedic Science 7, 199–207.
<https://doi.org/10.1007/s007760200034>

Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., 2007. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. *Cell Metabolism* 6, 472–483. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.004>

Zheng, A., Rahkila, P., Vuori, J., Rasi, S., Takala, T., Väänänen, H.K., 1992. Quantification of carbonic anhydrase III and myoglobin in different fiber types of human psoas muscle. *Histochemistry* 97, 77–81. <https://doi.org/10.1007/BF00271284>

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>

6 ANHANG

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schema der Autophagosomen Bildung.	4
Abbildung 2	Regulation der Autophagosom Bildung.	6
Abbildung 3	Aufbau des 26S Proteasoms.	8
Abbildung 4	Schematischer Aufbau eines Sarkomers.	10
Abbildung 5	Darstellung unterschiedlicher Titin Isoformen im Halbsarkomer.	12
Abbildung 6	BSA Verdünnungsreihe.	30
Abbildung 7	Messung der Proteasomaktivität.	31
Abbildung 8	Ergebnisse zur Bestimmung des Gesamt LC3-II Proteinlevels.....	33
Abbildung 9	Ergebnisse zur Bestimmung des p62/SQSTM1 Proteinlevels.	34
Abbildung 10	Ergebnisse zur Bestimmung der mTOR Aktivität.	35
Abbildung 11	Ergebnisse zur Bestimmung der AMPK Aktivität.	36
Abbildung 12	K63-Ubiquitinierungslevel von Titin.....	37
Abbildung 13	Bestimmung der Titin Degradation.	38
Abbildung 14	Ergebnisse zur Bestimmung des PSMA2 Proteinlevels.	39
Abbildung 15	Darstellung der Proteasomaktivitäten.	41
Abbildung 16	K48-Ubiquitinierungslevel von Titin.....	42
Abbildung 17	Titin Isoformen in Skelettmuskeln von STZ und ZSF1 Ratten	43

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	17
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.....	18
Tabelle 3: Primäre Antikörper	20
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper	21
Tabelle 5: Kits	21
Tabelle 6: Laborgeräte.....	22
Tabelle 7: Pipettierschema für zwei SDS-Standardgele.....	25
Tabelle 8: Pipettierschema für zwei Titingele	26

DANKSAGUNG

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte die Umsetzung meiner Dissertation in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältige Hilfe und Unterstützung möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen. Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Martina Krüger für die ausgezeichnete und unermüdliche „rund um die Uhr“ Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ohne Ihre dauerhafte Unterstützung in allen Belangen und Motivation in langwierigen Phasen wäre dieses Projekt nicht so schnell umgesetzt worden. Für konstruktive Anregungen danke ich ebenso Prof. Dr. Joachim Schmitt, der meine Doktorarbeit ebenfalls betreut hat. Außerdem möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Sebastian Kötter für die Beantwortung unzähliger Fragen meinen großen Dank aussprechen. Durch die konstante „erste Hilfe“ bei der thematischen Eingrenzung und inhaltlichen Ausrichtung hat er mich auf meinem Weg stets begleitet. Besonders geprägt hat mich die Unterstützung von Frau Sabine Bongartz, die mich nicht nur mit lieben Worten stets ermuntert hat nicht aufzugeben sondern mir zu jeder Zeit auch mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem gilt mein Dank Frau Sandra Berger, die durch Ihr großes Engagement stets ein offenes Ohr für Sorgen aller Art hatte. Für die finanzielle Unterstützung gilt mein spezieller Dank dem SFB 1116 des Graduiertenkollegs. Meinem Vater danke ich für seine unermüdliche Geduld, Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation. Ohne seine hilfreichen und humorvollen Ratschläge sowie Ermunterungen zur naturwissenschaftlichen Promotion konnte ich auch in schwierigen Phasen das Licht am Ende des Tunnels fest im Blick halten. Ein Teil der Arbeitsgruppe Krüger zu sein hat mich über eine lange Zeit im Studium begleitet und wird es hoffentlich noch weit darüber hinaus.

Zuletzt möchte ich mich für die wundervolle gemeinsam verbrachte Zeit bei meinen Freundinnen Leonie, Anna, Merle, Anke, Debbie und Linda bedanken. Mit euch war das Studium unvergesslich. Für die tiefe Freundschaft danke ich außerdem Suri, einer Freundin, meiner Heldin.