

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

Auswirkungen einer Myokardischämie auf das Sarkomerprotein Titin im Skelettmuskel

Dissertation

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

vorgelegt von
Alexander Johannes Kollenbroich
2023

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Wie ein Wesen schützen, dessen größtes Risiko von sich selbst ausgeht?

Es wurden bis zum Zeitpunkt der Promotion keine Teile dieser Arbeit veröffentlicht.

Zusammenfassung (deutsch)

Der Herzinfarkt (IR) und die sich oft daraus entwickelnde Herzinsuffizienz sind häufige Krankheitsbilder (1, 2). In vielen Fällen gehen diese zusätzlich mit einer Muskelschwäche einher (3, 4). Die beteiligten Mechanismen an diesem Prozess sind bisher unklar.

In dieser Arbeit wurde eine veränderte Muskelmechanik zu einem frühen Zeitpunkt, 12 Tage nach IR, bei der Maus charakterisiert. Das Sarkomerprotein Titin ist wesentlich für die passive Kraft einer Muskelzelle verantwortlich (5–8). Daher wurden zusätzlich bekannte mögliche Modifikationen des Titinproteins untersucht. Zur Betrachtung der Biomechanik wurden Einzelfaserkraftmessungen, zur Betrachtung von Signalwegen und der Proteindegradation *Western blots* und Gel-Färbungen durchgeführt.

Der Diabetes mellitus ist ebenfalls eine verbreitete Krankheit, die sowohl auf Herzkreislaufkrankungen als auch auf die Muskelfunktion einen Einfluss nehmen kann (1, 2, 9–11). Eine mögliche Bedeutung auch im Rahmen einer Myokardischämie für die Funktion des Skelettmuskels wurde mit einem spontanmutierten Leptin-Rezeptor-defizienten Maus-Modell (dBdB) untersucht. Als Kontrolle dienten heterozygote Tiere (dB+).

In dB+ Tieren waren 12 Tage nach IR sowohl die passive als auch die aktive Kraft der untersuchten Muskeln signifikant gesteigert. Bei dBdB war im *Musculus psoas* (M. psoas) die aktive und passive Kraft ohne IR bei dBdB bereits gegenüber der dB+-Kontrolle erhöht. Nach IR war hingegen bei den dBdB Tieren keine weitere signifikante Kraftsteigerung zu erkennen. Nach IR nahm zudem mit zunehmender Vordehnung die aktive Kraft überproportional schnell zu. Zusätzlich zeigte sich die Kalzium (Ca^{2+})-Sensitivität des M. psoas nach IR gesteigert. Die vermehrte Steifigkeit von Titin nach IR deckt sich mit Befunden, die am Herzen erhoben wurden, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit erstmals am Skelettmuskel gezeigt werden (12–17). Wie bereits am Herzen gezeigt (18–21), ist die Steigerung der Steifigkeit bei dBdB auch im Skelettmuskel reduziert.

Da für Titin auch eine Rolle in vielen Stoffwechselwegen der aktivitätsabhängigen Proteindegradation gezeigt wurde (22–33), könnten hier beobachtete frühe Modifikationen an Titin selbst, womöglich in ihrer Folge an der anschließenden Muskelatrophie ursächlich beteiligt sein.

Anders als im Herzmuskel (34), konnte nach IR keine vermehrte Phosphorylierung von Titin an Position S12022 festgestellt werden. Auch bei direkter Betrachtung der Proteinkinase C α (PKC α) fand sich eine verminderte aktivierende Phosphorylierung.

Wir konnten zudem Veränderungen in der Titin-Degradation nachweisen. So kam es am ehesten zur Reduktion der Konzentration eines spezifischen frühen Titinabbauproduktes (T2) im Verhältnis zum Gehalt intakten Titins (T1) nach IR, was entweder Ausdruck einer reduzierten primären Degradation von T1 zu T2 oder einer beschleunigten sekundären Degradation mit Abbau von T2 ist.

Summary (English)

In western countries myocardial infarction (*IR*) and heart failure are common morbidities (1, 2). In a large number of cases they occur together with skeletal muscle weakness (3, 4). The reason for the occurrence of this muscle weakness remains unclear.

In this paper we characterise changes in skeletal muscle mechanics at an early stage 12 days after *IR* in mice. Titin is a protein localised in the sarcomere, which is known to be of central importance for the passive force generated by muscle cells (5–8). This is why we investigated possible changes in the expression and modification of titin. Therefore we used western blots and acrylamide gel staining and studied biomechanical properties of different skeletal muscles using single fibre force measurements.

Diabetes mellitus is also a common disease, which is known to influence diseases of the circulative system as well as skeletal muscle function (1, 2, 9–11). To investigate a possible influence on muscle function after *IR* we used a spontaneously mutated leptin receptor deficient mice model (dBdB), which we compared to heterozygote controls (dB+).

In dB+ mice 12 days after *IR* passive as well as active force were both significantly elevated. Interestingly the force was already elevated in dBdB without *IR* in *Musculus psoas* (*M. psoas*) compared to dB+ and similar in *Musculus tibialis anterior* (*M. tibialis ant.*), but did not rise after *IR*. After *IR* active force rose disproportionately fast with rising prestretching. Additionally calcium sensitivity rose in *M. psoas* after *IR*.

Increased titin based passive stiffness conforms to earlier observations in the heart after *IR* (12–17), but are characterised for the first time in skeletal muscle as well. In difference to earlier observations in the heart this change in passive force of Titin was not associated with a elevated phosphorylation at S12022 of Titin. Regarding protein kinase C α (PKC α) itself we found a reduction of kinase activating phosphorylation, which is the opposite of what was observed in the heart (34). As it was demonstrated in the heart (18–21), the increase of passive force after *IR* is reduced in dBdB in the skeletal muscle.

As titin has been shown to interact with multiple regulators of activity-dependent protein degradation (22–33), changes in its properties observed here could also be a cause of subsequent protein degradation and muscle atrophy.

Additionally we could show changes in the degradation of titin, but not of the phosphorylation we investigated at serine 12022. We saw a reduction of a specific and early degradation product of titin (T2) compared to the total amount of undegradated titin (T1) after *IR*. This could either be the result of a reduced primary titin degradation or an elevated secondary degradation of titin resulting in degradation of T2.

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|---------------------------|---|---------------------|---|
| °C | <i>Celsius</i> | dB+ | <i>Mäuse mit einer heterozygoten Leptinrezeptordefizienz</i> |
| µg | <i>Mikrogramm</i> | dBdB..... | <i>Mäuse mit einer homozygoten Leptinrezeptordefizienz</i> |
| µl | <i>Mikroliter</i> | DTT | <i>Dithiothreitol</i> |
| A | <i>Ampere</i> | EGTA | <i>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure</i> |
| A-Bande | <i>anisotrope Bande</i> | eNOS | <i>endotheliale Stickstoffmonooxid-Synthase</i> |
| ACE ... | <i>Angiotensin-konvertierendes-Enzym</i> | Erk1/2 | <i>Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1/2</i> |
| ADP | <i>Adenosin-Diphosphat</i> | FNDC5 | <i>fibronectin type III domain containing 5</i> |
| AMP | <i>Adenosin-Monophosphat</i> | FoxO3..... | <i>Forkhead-Box-Protein O3</i> |
| AMPK | <i>Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase</i> | GAPDH..... | <i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i> |
| Ankrd2/Arpp | <i>Ankyrin repeat domain-containing protein 2</i> | GH | <i>Growth hormone</i> |
| APS | <i>Ammoniumperoxidsulfat</i> | G ₁₂ α.. | <i>α-Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins 2</i> |
| AS | <i>Aktivierungslösung</i> | GMEB-1 | <i>Glucocorticoid modulatory element binding Protein 1</i> |
| AT | <i>Angiotensin</i> | HDL..... | <i>high density lipoprotein</i> |
| AT1-7..... | <i>Angiotensin 1-7</i> | HRP | <i>Horse Raddish Peroxidase</i> |
| AT1-Rezeptor | <i>Angiotensin-Rezeptor 1</i> | HSP..... | <i>Heat shock Proteine</i> |
| ATII | <i>Angiotensin II</i> | HSP27..... | <i>Heat shock Proteine 27</i> |
| ATP..... | <i>Adenosin-Triphosphat</i> | HSP90..... | <i>Heat shock Proteine 90</i> |
| ATPase..... | <i>Adenosintriphosphat-abhängige Kinase</i> | I-Bande | <i>isotropen Bande</i> |
| BDM | <i>2,3-Butanedionmonoxid</i> | IgA..... | <i>Immunglobulin A</i> |
| BSA..... | <i>Bovines Serumalbumin</i> | Ig-Domäne... | <i>Immunglobuline-like-Domäne</i> |
| c(Ca ²⁺)..... | <i>Kalziumionenkonzentration</i> | IGF1 | <i>Insuline like Growth Factor 1</i> |
| C57BL/6J... | <i>transgene Black Six Mäuse von Janvier-Labs</i> | IL-1 | <i>Interleukin-1</i> |
| CaMK..... | <i>Calmodulinabhängige Kinase</i> | IL-10..... | <i>Interleukin 10</i> |
| CamKIIδ | <i>Calmodulin-abhängige Kinase IIδ</i> | IL-6..... | <i>Interleukin 6</i> |
| cAMP | <i>cyklisches Adenosin-Monophosphat</i> | IR | <i>Ischämie mit anschließender Reperfusion</i> |
| CARP | <i>Cardiac ankyrin repeat protein</i> | LIM-Proteine | <i>Lin-11, Islet-1, and Mec-3-Proteine</i> |
| cDNA | <i>komplementäre Desoxyribonukleinsäure</i> | M. EDL | <i>Musculus extensor digitorum longus</i> |
| cGMP | <i>cyklisches Guanosin-Monophosphat</i> | | |
| cm..... | <i>Zentimeter</i> | | |
| CRP | <i>C-reaktives Protein</i> | | |
| DARP..... | <i>Diabetes Related Ankyrin Repeat Protein</i> | | |

| | |
|---|---|
| <i>M. gastrocnemius</i> . <i>Musculus gastrocnemius</i> | PGC1 α <i>proliferator-activated receptor Gamma coactivator 1α</i> |
| M. psoas <i>Musculus psoas</i> | pH . <i>negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in wässigen Lösungen</i> |
| M. soleus <i>Musculus soleus</i> | PI3K <i>Phosphoinositol-3-Kinase</i> |
| <i>M. tibialis ant.</i> <i>Musculus tibialis anterior</i> | PICOT . <i>protein kinase C-interacting cousin of thioredoxin</i> |
| mA <i>Milliampere</i> | PKA <i>Proteinkinase A</i> |
| MAPKp70rKS6 . <i>Mitogen-aktivierte Kinase p70 ribosomale Kinase S6</i> | PKB/Akt <i>Proteinkinase Bα</i> |
| MARP <i>Muscle ankyrin repeat-Proteine</i> | PKC <i>Proteinkinase C</i> |
| MasR <i>Mas-Rezeptor</i> | PKC α <i>Proteinkinase C α</i> |
| MDM2 <i>murine double minute 2-Protein</i> | PKG <i>Proteinkinase G</i> |
| MEK1/2 ... <i>Mitogen-aktivierten Kinasen K 1 und 2</i> | PVDF <i>Polyvinylidenfluorid</i> |
| MgCl <i>Magnesiumdichlorid</i> | Ras <i>Rat Sarcoma Protein</i> |
| MHC <i>Myosin-Schweren-Ketten</i> | RoGPS2 <i>Regulator des G-Protein- Signalwegs 2</i> |
| ml <i>Milliliter</i> | ROS <i>reaktive Sauerstoffspezies</i> |
| MLP <i>Muskel-LIM-Protein</i> | rpm <i>rounds per minute</i> |
| mM <i>Millimolar</i> | RS <i>Relaxationslösung</i> |
| mm ² <i>Quadratmillimetern</i> | RT <i>Raumtemperatur</i> |
| mmol/L <i>Millimol pro Liter</i> | SDS <i>Natriumlaurylsulfat</i> |
| MMP <i>Matrix-Metalloproteinasen</i> | SERCA . <i>Sarcoplasmatic reticulum Calcium ATPase</i> |
| mN <i>Millinewton</i> | <i>sham</i> <i>sham-Kontrolle</i> |
| mTOR <i>mechanistic target of rapamycin</i> | SMAD2,3 <i>Mothers against decapentaplegic homolog 2 und 3</i> |
| MuRF1 <i>Muskel-RING-Finger-Protein 1</i> | SQSTM1 <i>Zink-Finger-Protein nbr1 und Ubiquitin-assoziiertes p62</i> |
| MuRF2 <i>Muskel RING-finger Protein 2</i> | SRF .. <i>Serum response Transkriptionsfaktors</i> |
| MyoD <i>Myogener Faktor 3</i> | T1 <i>Titinbande</i> |
| Na/K-ATPase <i>Natrium-Kalium-ATPase</i> | T2 <i>Titindegradationsbande</i> |
| NaCl <i>Natriumchlorid</i> | TBST <i>Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween20</i> |
| NaMgATP. <i>Natrium-Magnesium-Adenosin- Triphosphat</i> | TGF β <i>Tumor Growth Factor β</i> |
| NFAT ... <i>Nuclear factor of activatet T-Cells</i> | TNF α <i>Tumor-Nekrose-Faktor α</i> |
| NF κ B .. <i>Nukleären Faktors K der aktivierten B-Zelle</i> | TRIS-HCl <i>Tris(hydroxymethyl) aminomethan-hydrochlorid</i> |
| nm <i>Nanometer</i> | X-ROS <i>microtubules dependent reactive oxygen species</i> |
| NOX2 <i>Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat-Oxidase 2</i> | |
| p38MAPK <i>p38-Mitogen-aktivierte- Proteinkinase</i> | |
| PEVK-Region <i>Prolin-, Glutamin-, Valin- und Lysinreiche Region von Titin</i> | |

Z-Streifen.....*Zwischen Streifen*

Inhalt

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Relevanz | 1 |
| 1.2 | Interzelluläre Signalwege und Transmitter | 3 |
| 1.2.1 | Übersicht | 3 |
| 1.2.2 | GH/IGF-1-Achse | 4 |
| 1.2.3 | Hormonelle Achsen | 5 |
| 1.2.4 | Systemische Entzündungsreaktion | 7 |
| 1.2.5 | Myostatin-Signalweg | 9 |
| 1.2.6 | Angiotensin-Achse | 10 |
| 1.2.7 | Neurogene/ neurohumorale Signalwege | 11 |
| 1.3 | Zelluläre Signalwege | 12 |
| 1.3.1 | Übersicht | 12 |
| 1.3.2 | <i>mechanistic Target of Rapamycin</i> (mTOR)-Komplex | 12 |
| 1.3.3 | Calcium-Calmodulin-Calcineurin- <i>nuclear factor of activated T-cells</i> (NFAT)-Achse .. | 13 |
| 1.3.4 | Proteindegradation und Apoptose | 14 |
| 1.3.5 | Veränderungen der Muskelfasertypen | 15 |
| 1.3.6 | Oxidativer Stress | 17 |
| 1.3.7 | Proteinkinase C α | 18 |
| 1.3.8 | Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase (AMPK) | 19 |
| 1.4 | Kontraktiler Apparat in Skelettmuskelzellen | 21 |
| 1.4.1 | Sarkomerstruktur | 21 |
| 1.4.2 | Chemomechanische Krafttransduktion | 22 |
| 1.5 | Titin | 22 |
| 1.5.1 | Übersicht | 22 |
| 1.5.2 | Titinphysiologie und Mechanik | 23 |
| 1.5.3 | Titinmodifikationen | 25 |
| 1.5.4 | Titinabbau | 26 |
| 1.5.5 | Muscle Ankyrin Repeat Proteine (MARPs) | 27 |
| 1.5.6 | LIM-Proteine | 28 |
| 1.5.7 | Titinkinase | 29 |
| 1.5.8 | Pathologische Veränderungen am Herzen | 30 |
| 1.6 | Diabetes mellitus und Glucosestoffwechsel | 31 |
| 1.6.1 | Übersicht | 31 |
| 1.6.2 | Diabetische Muskelpathologie | 31 |
| 1.6.3 | Wechselwirkungen mit Herzerkrankungen | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.7 | Ziele der Arbeit..... | 34 |
| 2 | Material und Methoden | 35 |
| 2.1 | Probenmaterial und Präparation..... | 35 |
| 2.2 | Verwendete biologische Reagenzien | 35 |
| 2.3 | Verwendete chemische Reagenzien..... | 37 |
| 2.4 | Verwendete Lösungen | 40 |
| 2.5 | Materialien und Geräte | 42 |
| 2.6 | Verwendete Software..... | 45 |
| 2.7 | Biomechanik | 46 |
| 2.7.1 | Gewebepräparation..... | 46 |
| 2.7.2 | Passive Messungen..... | 47 |
| 2.7.3 | Aktive Messungen..... | 47 |
| 2.8 | Protein-Biochemie | 48 |
| 2.8.1 | Solubilisierung..... | 48 |
| 2.8.2 | Bradford-Proteinbestimmung | 48 |
| 2.8.3 | <i>SDS-Page</i> und <i>Western Blot</i> | 49 |
| 2.8.4 | Coomassie-Membranfärbung | 51 |
| 2.8.5 | Membran-Immunfärbung | 51 |
| 2.8.6 | <i>Imaging</i> | 51 |
| 2.8.7 | <i>Stripping</i> | 51 |
| 2.8.8 | Gel Direktfärbung..... | 52 |
| 2.8.9 | <i>Western-Blot</i> mit Titin als <i>Target-Protein</i> | 53 |
| 2.9 | Auswertung..... | 53 |
| 2.9.1 | Biomechanik..... | 53 |
| 2.9.2 | Biochemie..... | 54 |
| 3 | Ergebnisse..... | 56 |
| 3.1 | Biomechanik | 56 |
| 3.1.1 | passive Kraft..... | 56 |
| 3.1.2 | aktive Kraft..... | 57 |
| 3.1.3 | Maximale aktive Kraft unter Vordehnung..... | 58 |
| 3.1.4 | Kalziumsensitivität | 59 |
| 3.1.5 | Konsistenzprüfung der aktiven Kräfte..... | 61 |
| 3.2 | Molekularbiologie..... | 62 |
| 3.2.1 | Titingehalt | 62 |
| 3.2.2 | Titindegredation | 65 |
| 3.2.3 | Titinphosphorylierung | 67 |
| 3.2.4 | Proteinkinase Ca..... | 69 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2.5 | Adenosin-monophosphat-abhängige Kinase | 72 |
| 4 | Diskussion | 75 |
| 4.1 | Methodische Validität..... | 75 |
| 4.1.1 | Koronargefäßligation als Modell für den Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz..... | 75 |
| 4.1.2 | Leptin-Rezeptor-Defizienz als Diabetesmodell..... | 75 |
| 4.1.3 | Biomechanische Messungen | 76 |
| 4.1.4 | Biochemische Messungen | 77 |
| 4.2 | Einordnung der Ergebnisse..... | 78 |
| 4.2.1 | Passive Kraft..... | 78 |
| 4.2.2 | Aktive Kraft..... | 81 |
| 4.2.3 | PKC α | 85 |
| 4.2.4 | AMPK | 87 |
| 4.3 | Gegenüberstellung im Bezug auf Diabetes mellitus | 88 |
| 4.4 | Titin als Integrator und Stellschraube der mechanosensitiven Muskeltrophieregulation | 90 |
| 4.5 | Therapeutische Deduktionen im Hinblick auf körperliches <i>Training</i> | 92 |
| 4.6 | Ausblick..... | 95 |
| 5 | Literatur..... | 97 |
| | Danksagung..... | I |

1 Einleitung

1.1 Relevanz

Sarkopenie, eine Form der Muskelschwäche, deren Ursache innerhalb der Skelettmuskulatur liegt, ist eine häufige Begleiterkrankung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und geht mit erhöhter Sterblichkeit und einem erhöhten Risiko für Komplikationen einher. Die Zuckerkrankheit, Diabetes mellitus, kann ihrerseits sowohl das Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen als auch das von Muskelschwäche provozieren. Gleichzeitig kann der Diabetes mellitus jedoch in seiner Ausprägung durch eben diese Erkrankungen deutlich verschlechtert werden. Durch die hohe Prävalenz dieser Erkrankungen ergeben sich häufige Überschneidungen mehrerer Krankheitsbilder bei einem Patienten (siehe Abb. 1.1.1).

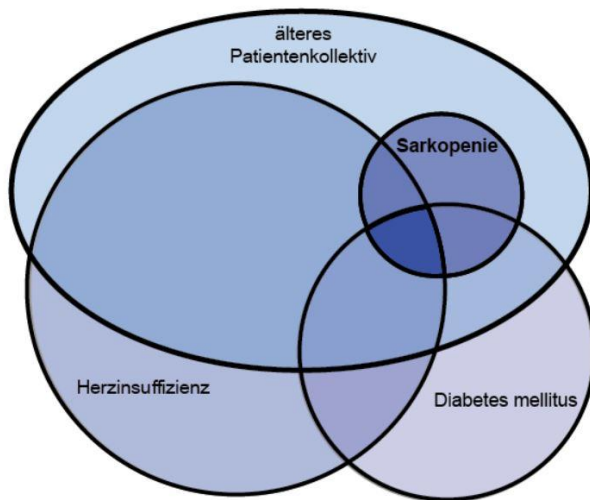


Abb. 1.1.1 Überschneidende Morbiditäten im typisch internistischen Patientenkollektiv. Schematische Darstellung häufiger Krankheiten und der sich hieraus ergebenden möglichen Komorbiditäten

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen zu den größten Herausforderungen unseres Gesundheitssystems. In den Vereinigten Staaten von Amerika litten 2017 6,3% der über 20-Jährigen an einer kardiovaskulären Erkrankung. Im gleichen Jahr betrug die Prävalenz des Myokardinfarkts 3% (1).

Ein nennenswerter Teil dieser Patienten entwickelt anschließend eine chronische Herzinsuffizienz. Dies betrifft circa 16% der Männer und 22% der Frauen über 45 (1). Dies verdeutlicht die Tatsache, dass kardiovaskuläre Erkrankungen einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz darstellen (2). Hervorzuheben ist außerdem, dass Patienten, deren Herzinsuffizienzen auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen sind, besonders schlechte Langzeitprognosen aufweisen (35, 36).

Die chronische Herzinsuffizienz ist für sich betrachtet ebenfalls eine weltweit bedeutende, schwere Erkrankung, die in ihrer Bedeutung bisher im Allgemeinen eher unterschätzt wird. So wurde im Jahr 2017 geschätzt, dass weltweit 20 Millionen Menschen unter einer chronischen Herzinsuffizienz leiden, wobei die Zahlen tendenziell weiter steigen (37, 38).

Die Sterbezahlen aufgrund chronischer Herzerkrankungen sind von 1990 bis 2010 um 40,8% gestiegen (39). Zudem ist durch die steigende Lebenserwartung in der Bevölkerung ein weiterer Anstieg der Inzidenz zu erwarten (40). In den Vereinigten Staaten von Amerika wird eine Steigerung um 46% im Jahr 2030 verglichen mit dem Jahr 2010 erwartet (41). In Deutschland beträgt die Inzidenz der Herzinsuffizienz 0,3% in der Gesamtbevölkerung mit einer Mortalität von 23% im ersten Jahr nach der Diagnosestellung (42). Zudem ist die Exazerbation, also die hämodynamische Entgleisung, bei der chronischen Herzinsuffizienz eine häufige Ursache für Krankenhausaufnahmen (43). Nach einer solchen Krankenhausaufnahme betrug die durchschnittliche Überlebenswahrscheinlichkeit für das anschließende Jahr lediglich 20 bis 40% (44). Trotz dieser weiten Verbreitung des Krankheitsbildes und seiner Schwere, zeigte sich in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands eine schlechte Kenntnis über die Herzinsuffizienz, was die Therapieeinsicht bei den betroffenen Patienten vermindert und deren Mitwirken an der Behandlung verschlechtert (45).

Eine für den Krankheitsverlauf wichtige und häufige Begleiterkrankung der chronischen Herzinsuffizienz ist die Sarkopenie. Dabei handelt es sich um ein Krankheitsbild, das sich durch eine reduzierte körperliche Leistungsfähigkeit bei verminderter Muskelfunktion und Muskelmasse

auszeichnet (46). Dieses Krankheitsbild ist zudem in der älteren Bevölkerung generell weit verbreitet (47–52), zeigt jedoch eine besonders häufige Inzidenz bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Insbesondere dann, wenn die Herzinsuffizienz auf eine Myokardischämie zurückzuführen ist (3). Obwohl Veränderungen im Muskelstoffwechsel speziell bei herzinsuffizienten Patienten schon lange bekannt sind (4), wird der Sarkopenie in Medizin und Forschung erst seit kurzem größerer Raum eingeräumt. Dies zeigt sich beispielsweise daran, dass die Erkrankung erst 2016 in das internationale Klassifikationssystem für Krankheiten (ICD) aufgenommen wurde (53).

Im Zusammenhang mit der Sarkopenie werden zudem noch weitere Symptomkomplexe beobachtet. So geht die Sarkopenie oft mit einer Kachexie, die bei vom Herzen ausgehenden Ursachen als kardiale Kachexie bezeichnet wird, einher (54). Das Krankheitsbild der Kachexie ist gekennzeichnet durch einen deutlichen Verlust an Körpergewicht, Muskelmasse und Fettgewebe (55). Auch die kardiale Kachexie ist eine häufige Begleiterkrankung der Herzinsuffizienz und konnte in einer Studie mit anschließender Datenanalyse bei 10% der herzinsuffizienten Patienten gezeigt werden (3, 56, 57).

Zudem wird bei herzinsuffizienten Patienten mit kardialer Kachexie gehäuft eine Anorexie, also einen Appetitverlust trotz verminderter Nahrungsaufnahme, beobachtet, die ihrerseits die körperliche Leistungsfähigkeit weiter reduziert (58) (siehe Abb. 1.1.2).

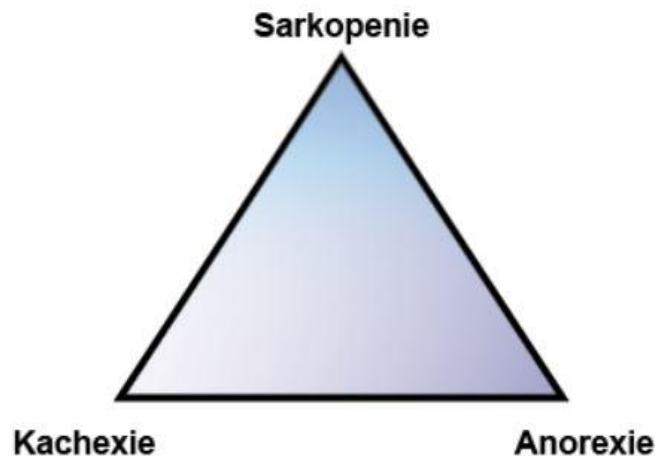


Abb. 1.1.2 Phänotypisch verwandte Pathologien. Schematische Darstellung der sich durch die synergistischen Effekte ergebenden gegenseitigen Verstärkung der Krankheitsbilder mit resultierenden fließenden Übergängen

Von besonderer Bedeutung ist außerdem, dass sowohl die kardiale Kachexie als auch die Sarkopenie bei Patienten mit und Patienten ohne Herzinsuffizienz mit einem deutlich verschlechterten *Outcome*, das heißt, mit einem schlechteren Krankheitsverlauf sowie einer höheren Sterblichkeit einhergehen (59–61). Obwohl auch ein genereller Gewichtsverlust im Sinne einer Kachexie mit einem schlechten *Outcome* assoziiert ist, korreliert mit diesem insbesondere eine reduzierte Skelettmuskelmasse beziehungsweise eine verminderte Muskelfunktion im Sinne einer Sarkopenie (62–64). So verdoppelt Sarkopenie in einer Studie die Drei-Jahres-Sterblichkeit in einem Kollektiv älterer Patienten (65). Zudem ist sie ein eigenständiger Risikofaktor für das Entstehen körperlicher Behinderungen (66). Durch eine Verminderung des HDL-Cholesterinspiegels erhöht die Sarkopenie indirekt das Risiko für Herz-Kreislauf-erkrankungen (67).

Für die bessere Korrelation eines schlechten *Outcomes* mit einer funktionalen Muskelschwäche, als mit der Skelettmuskelmasse, könnte ein Effekt verantwortlich sein, der sich auch beim physiologischen Alterungsprozess der Muskulatur findet. Bei älteren Patienten nimmt die durchschnittliche Muskelkraft jährlich um 3% ab, während die durchschnittliche Skelettmuskelmasse lediglich um 1% pro Jahr abnimmt (68). Folglich reduziert sich jährlich die Skelettmuskelqualität und dieser funktionale Qualitätsverlust scheint analog zu den bestehenden Stoffwechselveränderungen im Skelettmuskel bei der Herzinsuffizienz (4) für das *Outcome* entscheidend zu sein. Korrespondierend hierzu zeigte sich bei Krebspatienten mit guter Muskelfunktion ein längeres Gesamtüberleben (69). Diese Korrelationen verdeutlichen, dass bei schwerer Erkrankung mit Einfluss auf die Skelettmuskulatur, deren Physiologie von entscheidender systemischer Relevanz ist.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass gemessen am klinischen Bild ischämische Erkrankungen des Herzens die Muskelfunktion und den Muskelstoffwechsel beeinträchtigen und diese wiederum für den Krankheitsverlauf und die Sterblichkeit betroffener Patienten von entscheidender Bedeutung sind.

Eine weitere wichtige Komorbidität von Herzkreislauferkrankungen ist der Diabetes mellitus. Er stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar (2) und ist daher und aufgrund seiner generellen Häufigkeit in der westlichen Bevölkerung für dieses Krankheitsbild von großer Bedeutung. So leiden in den Vereinigten Staaten von Amerika 23,4 Millionen Erwachsene an einem Diabetes mellitus und zusätzliche 81,6 Millionen Erwachsene zeigen Anzeichen eines Prädiabetes, also einer Vorform des Diabetes (1). Insbesondere in älteren Kollektiven graviert sich diese hohe Inzidenz weiter: Bei Patienten, mit einem Alter von über 65 Jahren, weisen 26,9% einen Diabetes mellitus und weitere 50% einen Prädiabetes auf (9).

Zusätzlich scheint der Diabetes mellitus außerdem signifikanten Einfluss auf die Sarkopenieentwicklung im Rahmen einer Herzinsuffizienz zu nehmen. Auch bei diabetischen Patienten ohne Herzinsuffizienz lassen sich Veränderungen im Muskelstoffwechsel nachweisen. So konnte gezeigt werden, dass die Muskelstärke der Extremitäten bei Diabetikern verglichen mit Gesunden signifikant reduziert ist, während die Muskelmasse sich signifikant erhöht zeigt. Dieser Effekt ist umso ausgeprägter, je länger der Diabetes mellitus besteht und je schlechter der Blutzucker eingestellt ist (10). Gestützt wird eine eventuelle Analogie dieses Mechanismus zur Sarkopenie bei Herzinsuffizienz dadurch, dass die Sarkopenie funktional bei bestehender Insulinresistenz verstärkt war (11). Empirisch zeigt sich dieser Effekt zudem darin, dass bei Herzinsuffizienz insbesondere die Inzidenz der sarkopenischen Adiposität, also dem gleichzeitigen Vorliegen einer Sarkopenie mit einem krankhaften Übergewicht, erhöht ist (70).

Umgekehrt scheinen die Stoffwechselveränderung in der Skelettmuskulatur bei Herzinsuffizienz ihrerseits den Verlauf des Diabetes mellitus ungünstig zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die insulinabhängige Glucoseaufnahme im Skelettmuskel nach Herzmuskelischämie reduziert ist (71). Das gleiche Bild ergibt sich auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Hier ist die insulinabhängige Glucoseaufnahme der Skelettmuskeln gegenüber gesunden Probanden um 20% reduziert (72).

Es wird also deutlich, dass sich das Krankheitsbild des Diabetes mellitus und das der Sarkopenie bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder einer anderen ischämischen Herzerkrankung gegenseitig ungünstig beeinflussen, sodass sich auch hier pathophysiologische Interaktionen andeuten. Diese Wechselwirkungen sind von klinischer Relevanz und könnten zum Verständnis der Krankheitsbilder beitragen.

Diese Arbeit widmet sich daher der Betrachtung funktioneller Veränderungen in Skelettmuskeln in Antwort auf eine Herzmuskel-Ischämie auch vor dem Hintergrund eines Diabetes mellitus.

1.2 Interzelluläre Signalwege und Transmitter

1.2.1 Übersicht

Im Zusammenhang mit einer Muskelschwäche nach einem Herzinfarkt oder bei Herzinsuffizienz sind Veränderungen in einer Vielzahl von Signalwegen gefunden worden, die eine kausale Rolle bei dieser Erkrankung spielen könnten. Allerdings ist die genaue Pathogenese weiterhin unklar und es kann kein einzelner Botenstoff identifiziert werden, der die skelettmuskulären Veränderungen vollständig erklären könnte. Vielmehr legen die bisherigen Daten ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Signalwege nahe, die in ihrer Kombination für die skelettmuskulären Veränderungen und in der Folge für die Veränderungen in der Muskelmechanik verantwortlich zu sein scheinen.

Das folgende Kapitel widmet sich den wesentlichen Signalwegen, die im Zusammenhang der Arbeit relevant erscheinen und eine mögliche Brücke zwischen infarktbedingten Stoffwechselveränderungen am Herzen und einem dadurch kausal veränderten Muskelstoffwechsel bilden. Dabei werden insbesondere die Wachstumshormon (GH)-*Insuline like Growth Factor 1* (IGF1)-Achse, hormonelle Achsen wie Adiponektin, Ghrelin, Leptin und Apelin, inflammatorische Zytokine wie Tumornekrose-Faktor α (TNF α), Myostatin, die Angiotensin-Achse und zuletzt neuronale bzw.

neurohumorale Signalwege dargestellt. Die Beeinträchtigungen dieser Signalwege könnten im Zusammenspiel die Grundlage für die Veränderungen im Skelettmuskelstoffwechsel sein, die bei Herzinsuffizienz und nach Herzinfarkt gefunden werden, sind aber weiterhin Gegenstand von Diskussionen.

Zudem werden insbesondere Parallelen und Unterschiede zu Veränderungen im Rahmen einer herkömmlichen Sarkopenie ohne Herzerkrankung sowie altersbedingte Veränderungen in den Signalwegen herausgearbeitet. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der scheinbar oft ähnlichen Pathogenese und schwierigen Abgrenzbarkeit beider Mechanismen bei erkrankten Patienten relevant.

1.2.2 GH/IGF-1-Achse

Der Wachstumshormon (GH)-*Insuline like Growth Factor 1* (IGF1)-Achse kommt eine wichtige Bedeutung bei der Regulation des Wachstums und des Anabolismus zu, indem sie den *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Proteinkinase B α (PKB/Akt)-Weg und die Calcineurin-*Nuclear factor of activated T-Cells* (NFAT)-Achse aktiviert (73, 74) (siehe Abb. 1.2.1).

Obwohl man in diesem Zusammenhang also eine verminderte Aktivität der Achse bei einer Muskelatrophie vermuten würde, konnte gezeigt werden, dass der GH-Spiegel bei kachektischen Herzinsuffizienz-Patienten erhöht ist (75). Da jedoch gleichzeitig das GH-bindende Protein im Serum ebenfalls erhöht ist (76), das die Wirkung von GH-hemmt (77), ist unklar, ob die Achse vermehrt, vermindert oder gemessenen an ihrer Effektivität unvermindert aktiv ist. Ihr könnte also, wenn die Achse effektiv vermehrt aktiv ist, eine kompensatorische Rolle zukommen.

Für eine möglicherweise defizitäre Aktivität spricht allerdings, dass ein künstlich erhöhter IGF-1-Spiegel die Myosin-Degradation im Skelettmuskel nach einem Herzinfarkt senken konnte (78). Zudem sind Herzmuskelzellen physiologischerweise in der Lage in Antwort auf Zeldehnung IGF1 zu sekretieren (79). Wenn es also analog dazu bei einem Herzinfarkt zu einer vermehrten mechanischen Beanspruchung des Herzmuskels und in der Folge zu einer erhöhten Freisetzung von IGF1 käme, könnte dies im Sinne einer *Feedback*-Inhibition (80) die Beeinträchtigung der GH-Aktivität erklären.

Der IGF1-Signalweg interagiert scheinbar mit einer Reihe weiterer Signalwege, die im Kontext der Muskelschwäche relevant sein könnten. So korreliert bei Herzinsuffizienz der GH-Spiegel gut mit dem Leptinspiegel (76)., Während Angiotensin II die IGF1-Expression im Skelettmuskel hemmt (81), hat Myostatin keinen direkten Einfluss auf IGF1 (82–84).

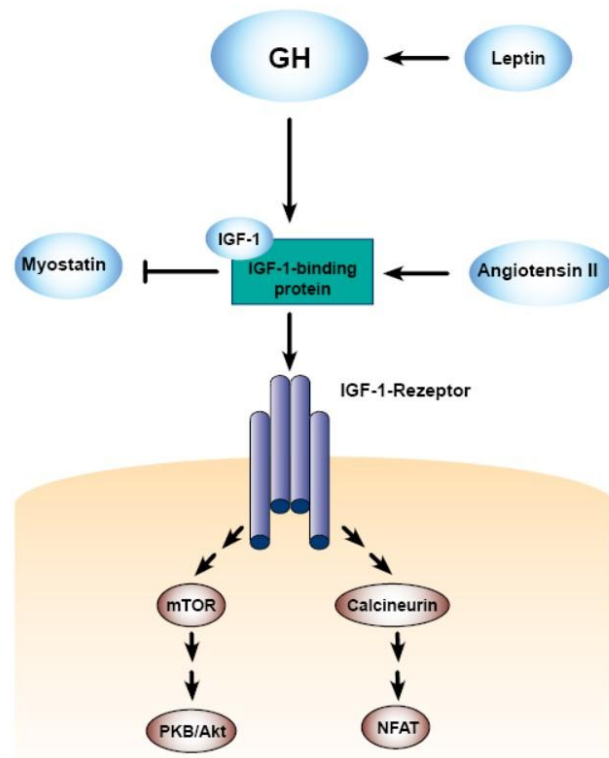


Abb. 1.2.1 Der Growth-Hormon (GH)/ Insuline-like-Growth-Factor (IGF-1)-Weg im Skelettmuskel. GH stimuliert in unterschiedlichen Geweben die Bildung von IGF-1 und wird seinerseits durch Leptin in seiner Freisetzung stimuliert. IGF-1 bindet im Serum an das *IGF-1-binding protein*. Es wird in seiner Aktivität durch Angiotensin II stimuliert und hemmt die Aktivität von Myostatin. Es bindet auf Skelettmuskelzellen den IGF-1-Rezeptor und stimuliert hierüber durch Signalkaskaden den *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Proteinkinase B α (PKB/Akt)-Weg und die Calcineurin-*Nuclear factor of activated T-Cells* (NFAT)-Achse

Andersherum konnte jedoch an Herzmuskelzellen gezeigt werden, dass IGF1 die Myostatinexpression als Antwort auf Dehnung reduziert (79).

1.2.3 Hormonelle Achsen

Auch für andere Hormone, insbesondere solche die mit der Stoffwechsel-, Körpergewichts- und Nahrungsaufnahmenregulation im Zusammenhang stehen, konnten Verbindungen zur kardial bedingten Muskelschwäche gezeigt werden. Dies betrifft Adiponektin, Ghrelin, Leptin und Apelin.

Diese Beobachtung korrespondiert mit der Feststellung, dass bei Herzinsuffizienz besonders häufig eine Kachexie (85) oder aber eine sarkopenische Adiposität auftreten (70). Unterernährung im Allgemeinen korreliert bei Herzinsuffizienz mit einer vermehrten Muskelschwäche, erhöhten Sterblichkeit und Kachexie (86). Störungen in der Muskelatrophie korrelieren also mit Störungen im systemischen Energie- und Fettgewebshaushalt.

Entgegen der Erwartungen konnte gezeigt werden, dass ein prämorbidem Übergewicht bei kritischer Krankheit in einem gewissen Maße vor Muskelabbau und Muskelschwäche schützt (87). Vermutlich liegt dies daran, dass in diesem Fall zunächst die Fettreserven mobilisiert werden. Diese Beobachtung

wird auch als Obesity-Paradox bezeichnet. Auch unter physiologischen Bedingungen ist eine Korrelation von Körperfettmasse und Muskelmasse und Kraft bekannt (88). Daher kann vermutet werden, dass ein erhöhter Körperfettanteil bei Einstellung einer pathologisch-katabolen Stoffwechsellaage den Abbauprozess verlangsamt, pathophysiologisch aber das Zustandekommen einer solchen Stoffwechsellaage begünstigt.

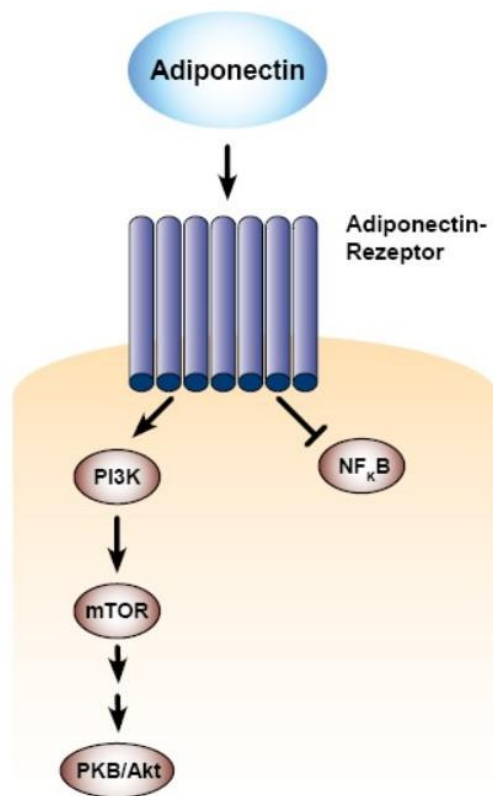


Abb. 1.2.2 Der Adiponektin-abhängige Signalweg. Adiponektin bindet an den Adiponektin-Rezeptor. Hierüber hemmt es intrazellulär den Nukleären Faktors K der aktivierten B-Zelle (NF_κB) und stimuliert über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) den mechanistic target of rapamycin (mTOR)-Proteinkinase Ba (PKB/Akt)-Weg

Adiponektin ist ein Hormon, das physiologischerweise negativ mit dem Körpergewicht korreliert (89). Bei Herzinsuffizienz ist der Adiponektinspiegel erhöht (89, 90), korreliert mit deren Schwere und Mortalität der Erkrankung und ist bei kachektischen Patienten am höchsten (89, 91). Physiologisch ist bekannt, dass Adiponektin die Aktivität des Nukleären Faktors K der aktivierten B-Zelle (NF_κB) reduziert (92), der insbesondere in entzündlichen Signalwegen eine Rolle spielt, und gleichzeitig über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) den mTOR-Akt-Weg stimuliert (92) (siehe Abb. 1.2.2). Damit wirkt es mechanistisch am ehesten einem Muskelabbau entgegen. Im Unterschied zur Muskelschwäche bei Herzinsuffizienz ist es bei altersbedingter Sarkopenie reduziert (93) und daher dort womöglich mit ursächlich für den Muskelabbau. Da es bei Herzinsuffizienz erhöht ist, ist in diesem Zusammenhang am ehesten von einer kompensatorischen Funktion oder aber von einer beeinträchtigten Funktion seiner Effektorwege auszugehen.

Auch der Ghrelin-Spiegel ist bei kachektischen Herzinsuffizienzpatienten erhöht (75). Nach einem Herzinfarkt reduziert es den skelettmuskulären Muskelverlust über eine Reduktion von Muskel-RING-Finger-Protein 1 (MuRF1) und Atrogin 1 (94). Ghrelin reduziert im Skelettmuskel bei Herzinsuffizienz die Entzündung, hemmt die mitochondriale Dysfunktion und verbessert die reduzierte Insulinsensitivität (95, 96) (siehe

Abb. 1.2.3). Der Einfluss scheint insbesondere in schnellen oder gemischten Muskeln ausgeprägt zu sein, in denen es den Triglyceridabbau stimuliert (95). Interessanterweise konnte für Ghrelin-Analoga

bei Muskelschwäche im Rahmen anderer Kachexieformen wie bei einer malignen Erkrankung keine lindernde Wirkung nachgewiesen werden (97, 98). Diese Spezifität kann als Hinweis auf einen spezifischen mechanistischen Zusammenhang gedeutet werden. Allerdings scheint es sich in Anbetracht seiner Muskelatrophie-reduzierenden Wirkung und seiner erhöhten Spiegel bei Herzinsuffizienz ebenfalls um einen Kompensationsmechanismus zu handeln.

Ein weiteres Hormon, dessen Spiegel bei Herzinsuffizienz erhöht ist, ist das Leptin (76). Der Spiegel ist zudem auch bei Sarkopenie ohne Herzinsuffizienz erhöht (93). Leptin vermittelt ein Sättigungsgefühl und ist an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt (99). Es steigt bei erhöhter Fettmasse und mit steigendem Alter an und wird als entscheidender Signalstoff bei der verminderten Nahrungsaufnahme im Alter betrachtet (100–102), wobei der Spiegel normalerweise ab dem 65. Lebensjahr wieder sinkt (102). In diesem Zusammenhang kann man vermuten, dass bei älteren Patienten die Wirksamkeit von Leptin gesteigert ist, da niedrigere Konzentrationen scheinbar trotzdem zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führen. Es vermittelt zudem die Inappetenz bei Entzündung, da der Spiegel durch $TNF\alpha$ und Interleukin-1 (IL-1) erhöht wird (99), während IL-1 gleichzeitig seinen

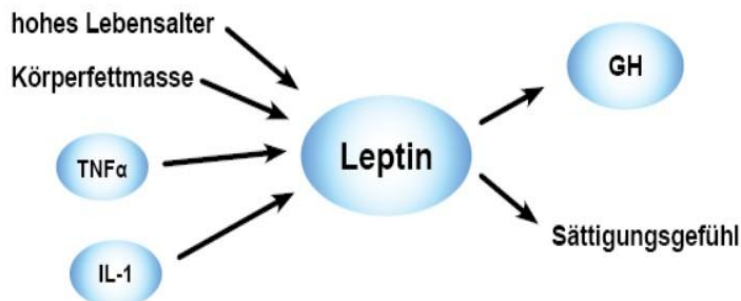


Abb. 1.2.4 Die Rolle von Leptin als Signalstoff. Die Leptinausschüttung wird abhängig von einem hohen Lebensalter sowie einer erhöhten Körperfettmasse gesteigert. Zudem wird es vom Tumor-Nekrose-Faktora ($TNF\alpha$) und Interleukin-1 (IL-1) stimuliert. Seinerseits steigert Leptin das subjektive Sättigungsgefühl und stimuliert die *Growth Hormon* (GH)-Sekretion

werden (108). Physiologischerweise wird Apelin nach Muskelschäden hochreguliert und verbessert die Muskelregeneration, was bei älteren Probanden nur noch vermindert geschieht, wobei diese generell einen verminderten Apelin-Spiegel aufweisen (107).

Für Apelin ist ein Einfluss auf mehrere Signalwege im Skelettmuskel bekannt. Die regenerationsfördernde Wirkung könnte darin begründet sein, dass es die mTOR-Akt/PKB-Wachstumsachse stimuliert (107, 109, 110). Es induziert außerdem Angiotensin-1 und dessen Rezeptor (111), welches seinerseits ebenfalls die Muskelkraft und Regeneration fördert (112). Es erhöht zudem die Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase-(AMPK)-Phosphorylierung, was einen

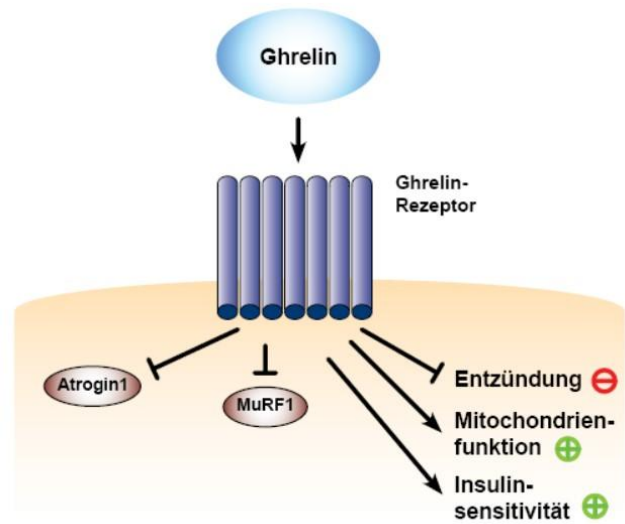


Abb. 1.2.3 Der Ghrelin-abhängige Signalweg. Ghrelin bindet an den Ghrelin-Rezeptor. Über diesen werden eine zelluläre Entzündungsreaktion sowie Atrogin 1 und Muskel-RING-Finger-Protein 1 (MuRF1) gehemmt. Es stimuliert die zelluläre Mitochondrienfunktion und die Insulinsensitivität

seinen Gegenspieler Neuropeptid Y und somit auch die Nahrungsaufnahme reduziert (103) (siehe Abb. 1.2.4). Da derartige inflammatorische Marker bei Kachexie vermehrt auftreten (75, 104, 105) könnte dies womöglich die Korrelation erklären.

Sowohl bei Herzinsuffizienz (106) als auch bei Sarkopenie ist der Spiegel eines anderen Hormons, des Apelins, reduziert (107). Bei Letzterer konnten zudem epigenetische Veränderungen in dessen Signalweg nachgewiesen

kraftsteigernden Effekt hat (107, 113). Gleichzeitig stimuliert es aber auch die Expression von Genen, die für den intrazellulären Proteinabbau und die Autophagie relevant sind (107) (siehe Abb. 1.2.5).

Die Ausschüttung wird neben der Aktivierung durch Muskelschaden auch durch körperliche Aktivität, erhöhtes intrazelluläres Calcium und cykliches Adenosin-Monophosphat (cAMP) stimuliert (107, 114). Neben der Skelettmuskulatur erfolgt eine Synthese auch im Herzen (106) und in Adipozyten (115). Interessanterweise führt sowohl ein Mangel als auch eine Überexpression an Apelin zu einer Herzmuskelhypertrophie (116, 117). Im ersten Fall konnte eine verminderte Expression Apoptose-relevanter Proteine nachgewiesen werden (116), in letzterem Fall ist die PI3K-abhängige Wachstumssignalachse hyperaktiv (117). Am Skelettmuskel führt ein Mangel an Apelin zu einer Faserhypoplasie und Muskelatrophie bei verminderter Kraft. (107).

Während die Bildung von Apelin durch Insulin stimuliert wird, sodass es bei Hyperinsulinämie zu erhöhten Spiegel kommt, sind die Spiegel bei einem Insulinmangel reduziert (115). Apelin vermindert seinerseits im Modell ein ernährungsinduziertes Übergewicht (111). Womöglich durch Induktion einer erhöhten oxidativen und metabolischen Kapazität der Muskulatur bei durch die AMPK induzierter erhöhter Glucoseaufnahme (107, 111, 113). Es scheint also über seine Wirkung

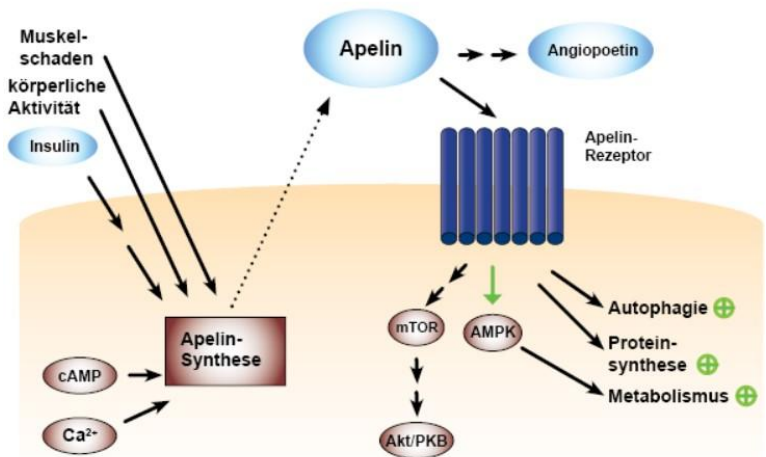


Abb. 1.2.5 Das Apelin-abhängige Signaling. Die intrazelluläre Apelin-Synthese wird durch körperliche Aktivität und muskulären Schaden gesteigert. Zudem wird sie durch einen Insulin-abhängigen Signalweg, eine erhöhte intrazelluläre Calciumionen-Konzentration sowie cykliches Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) stimuliert. Apelin seinerseits stimuliert indirekt die Angiotensin-Aktivität und bindet zellulär am Apelin-Rezeptor. Dieser stimuliert den *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Proteinkinase B α (PKB/Akt)-Weg sowie über die Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase (AMPK) den zellulären Metabolismus. Zudem steigert es gleichzeitig die zelluläre Autophagie wie auch Proteinsynthese

1.2.4 Systemische Entzündungsreaktion

Eine weitere wichtige Gruppe von Signalwegen bei der Herzinsuffizienz sind Mediatoren einer systemischen Entzündungsreaktion. Erhöhte TNF α -Spiegel konnten sowohl bei reiner chronischer Herzinsuffizienz (118, 119) als auch insbesondere bei Herzinsuffizienzpatienten mit Kachexie (118, 119) nachgewiesen werden. Die erhöhten Spiegel finden sich auch in der Skelettmuskulatur (120). Neben TNF α finden sich bei Herzinsuffizienz auch erhöhte IL-1, C-reaktives Protein (CRP)-, löslicher ST2-Rezeptor- und IL-6-Spiegel. Hierbei sind der TNF α - und der Cortisonspiegel bei Kachexie verglichen mit denen bei nicht-kachektischen Patienten erhöht (121, 122). Teilweise lassen sich erhöhte Spiegel inflammationsassoziiert Mediatoren auch direkt nach Herzinfarkt nachweisen (123).

Neben den proinflammatorischen Zytokinen, finden sich bei Herzinsuffizienz jedoch auch erhöhte Spiegel antiinflammatorische Zytokine wie *Tumor Growth Factor β* (TGF β), löslicher ST2-Rezeptor und Interleukin 10 (IL-10), wobei jedoch deren Steigerung geringer ausfällt als die der proinflammatorischen Zytokine (124, 125). Für den ST2-Rezeptor ist nachgewiesen, dass dieser nach mechanischem Stress von Kardiomyozyten sekretiert wird und eine antiapoptotische Wirkung am Herzen zeigt (123, 126). Diese Daten suggerieren, dass es bei der Herzinsuffizienz systemisch zu einer

Dysregulation der Entzündungssignalwege mit einer Begünstigung proinflammatorischer Wege kommt.

Unabhängig von einer Herzerkrankung finden sich bei älteren Menschen generell erhöhte Zytokinspiegel (127), insbesondere beim Vorliegen einer Sarkopenie (11, 93, 128, 129) und korrelieren dann teilweise mit der Schwere des Krankheitsbildes (130, 131). Zudem konnte bei Sarkopenie-Patienten eine vermehrte Aktivität von NF_κB und des Januskinaseweges nachgewiesen werden (132). Dieser Umstand verdeutlicht erneut die möglichen Interaktionen zwischen altersbedingter Sarkopenie und der kardialen Kachexie bei zusätzlicher Herzinsuffizienz, da es in beiden Fällen zu einer Aktivierung inflammatorischer Signalwege kommt.

Viele der bei Herzinsuffizienz vermehrt gebildeten proinflammatorischen Zytokine aktivieren intrazellulär NF_κB (133, 134), was auf die Skelettmuskulatur atroph wirkt (135) und über eine autokrine Interleukin 6 (IL-6)-Produktion AMPK induziert (136, 137). Diese autokrine Freisetzung wird über die ebenfalls vermehrt aktive Angiotensin-Achse verstärkt (138). Es kommt zu einer vermehrten Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (139) und zu einer reduzierten Expression von oxidativen Stoffwechsellenzymen (140–142). Zudem induzieren Inflammatorische Wege *Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1/2* (Erk1/2) und die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (143). Durch eine Stimulation der p38-Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (p38MAPK) kommt es zudem zu einer gesteigerten Myostatinexpression (120) (siehe Abb. 1.2.6).

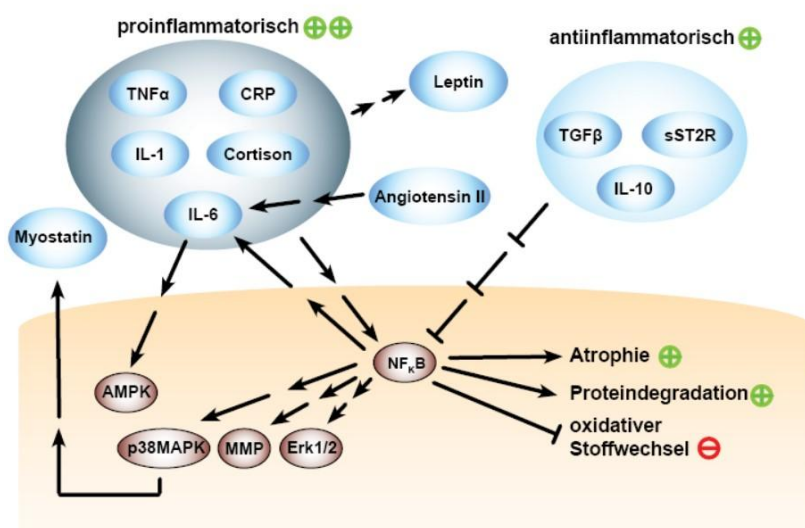


Abb. 1.2.6 Übersicht des Einflusses inflammatorischer Mediatoren auf die Muskelatrophie und Funktion bei Herzinsuffizienz. Dargestellt sind die proinflammatorischen Mediatoren Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin-1 (IL-1) Cortison und Interleukin-6 (IL-6). Diese Gruppe wird bei Herzinsuffizienz deutlich gesteigert aktiviert. Sie stimuliert indirekt die Leptin-Aktivität und IL-6 wird indirekt durch Angiotensin II stimuliert. Intrazellulär stimulieren sie zudem indirekt die Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase (AMPK) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF_κB), der seinerseits IL-6 stimuliert. Zudem dargestellt ist die Gruppe der antiinflammatorischen Mediatoren *Tumor-Growth-Factor* β (TGF β), löslicher ST2-Rezeptor (sST2R) und Interleukin-10 (IL-10), die ebenfalls bei Herzinsuffizienz leicht gesteigert aktiviert sind und indirekt NF_κB hemmen. NF_κB stimuliert über die p38-Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (p38MAPK), indirekt die Myostatinbildung sowie die Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) und die *Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1/2* (ERK 1/2). Es fördert die Skelettmuskuläre Atrophie und Proteindegradation und hemmt den oxidativen Stoffwechsel

Ein weiterer Einfluss, der im Zusammenhang mit Muskelatrophie und Kachexie nicht vernachlässigt werden sollte, sind Veränderungen der Nahrungsaufnahme. Da eine verminderte Nahrungsaufnahme, sowie physiologische Störungen in der Nährstoffresorption im Darm zu einem vermehrten Katabolismus führen können, könnten auch diese einen relevanten Einfluss auf die Muskelatrophie bei Herzinsuffizienz haben.

Dass der Appetitregulation bei der Kachexie eine entscheidende Bedeutung zukommt, konnte bereits für die Krebs-Kachexie gezeigt werden (144) und spielt vermutlich auch bei der kardialen Kachexie eine Rolle. Inflammatorische Mediatoren erhöhen den Leptinspiegel (99) und senken gleichzeitig den Neuropeptid Y-Spiegel (103), was beides zu einem verminderten Appetit und einer reduzierten Nahrungsaufnahme führt.

Auch Veränderungen in der

Darmphysiologie mit einem Einfluss auf die systemische Inflammation bei Herzinsuffizienz sind bekannt. So ist bei kachektischen Herzinsuffizienzpatienten die Mesenterialgefäß-Durchblutung reduziert und es kommt klinisch vermehrt zu Aufstoßen, Übelkeit und Erbrechen (145). Es findet sich zudem ein vermehrtes intestinales Bakterienwachstum, bei erhöhter Darmwanddicke, was als Korrelat eines entzündungs- oder stauungsbedingten Ödems interpretiert werden kann, und vermehrten Immunglobulin A (IgA)-Antikörpern gegen Polysaccharide (145). Dies spricht für eine Störung des Mikrobioms beziehungsweise damit einhergehend für eine beeinträchtigte Immuntoleranz dessen.

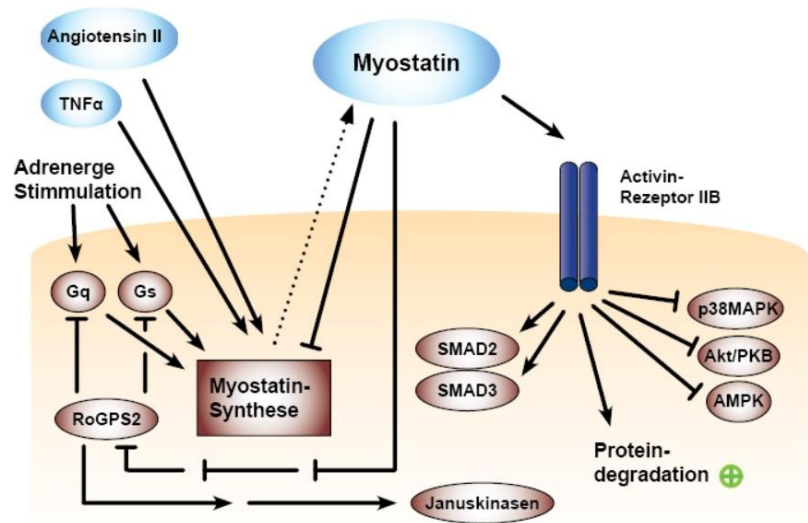
Von Darmbakterien produzierte Enterotoxine erhöhen die Konzentration inflammatorischer Mediatoren (146), was seinerseits die Nahrungsaufnahme reduziert (99). Ein weiterer Hinweis, dass derartige Entgleisungen der Darmfunktion auch bei der kardialen Kachexie eine Rolle spielen, besteht darin, dass eine proteinreiche hochkalorische Nahrungsergänzung sowohl bei der chronischen Herzinsuffizienz, als auch bei der Sarkopenie ohne Herzinsuffizienz die Konzentration systemischer Entzündungsmediatoren senken kann (147, 148).

1.2.5 Myostatin-Signalweg

Ein weiterer Signalstoff, für den ein Zusammenhang mit der kardialen Kachexie beschrieben ist, ist das Myostatin. Eine erhöhte Expression im Skelettmuskel konnte bei Herzinsuffizienz und ein erhöhter Spiegel im Serum bereits zehn Minuten nach einem Herzinfarkt nachgewiesen werden (84, 149, 150). Bei Herzinsuffizienz wurden sowohl erhöhte als auch unveränderte Serum-Spiegel beschrieben, welche sich gleichermaßen im Skelettmuskel finden (150, 151). Bei gleichzeitig bestehender Kachexie sind zudem sogar verminderte Spiegel beschrieben worden (85). Gut etabliert ist, dass Myostatin im Skelettmuskel zu einer Atrophie führt (84, 120, 152).

Physiologisch stimuliert Myostatin *Mothers against decapentaplegic homolog 2 und 3* (SMAD2,3) und die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (83, 84). Es hemmt die p38 MAP-Kinase und Akt

sowie den Regulator des G-Protein-Signalwegs 2 (RoGPS2). Dieser hemmt seinerseits die α -1 und β -adrenergen Signalwege über die Hemmung von Gs und Gq-Proteinen (82, 83, 153, 154). Somit bewirkt Myostatin die Enthemmung der adrenergen Stimulation. Gleichzeitig stimuliert Myostatin über SMAD2,3 die Aktivierung entzündungsassoziierter Januskinasen (155). Auf einem anderen Weg hemmt es zusätzlich die AMPK-Aktivität



(153) (siehe Abb. 1.2.7).

Abb. 1.2.7 Das Myostatin-abhängige Signaling. Angiotensin II und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) stimulieren die zelluläre Myostatin-Synthese sowie auch eine adrenerge Stimulation über kleine G-Proteine (Gq,Gs). Die Synthese wird von Myostatin direkt gehemmt sowie indirekt über eine Enthemmung des Regulators des G-Protein-Signalwegs 2, der seinerseits zudem indirekt Januskinasen aktiviert. Myostatin bindet und aktiviert den Activin-Rezeptor IIB, der die zelluläre Proteindegradation fördert. Er stimuliert zudem Mothers against decapentaplegic homolog 2 und 3 (SMAD2/3) und hemmt die p38-Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (p38MAPK), die Proteinkinase Ba (PKB/Akt) und die Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase (AMPK)

Am Herzmuskel kommt dem Signalwege eine wichtige Rolle in der Hypertrophievorbeugung zu. Es wird dehnungsabhängig in Herzmuskelzellen sekretiert und hemmt seine eigene Transkription (79, 83, 156). Diese wird zudem auch von IGF-1 und der p38 MAP-Kinase gehemmt (79, 83, 156). Es wirkt einer hypertrophen Herzinsuffizienz entgegen (153).

Im Rahmen eines Herzinfarktes scheint die Wirkung unterschiedlicher Signalwege in einem Missverhältnis auf die Skelettmuskulatur übertragen zu werden. So konnte gezeigt werden, dass im Skelettmuskel zunächst sowohl der myostatinabhängige Signalweg, als auch die p38 MAP-Kinase und Akt vermehrt aktiv sind. Bereits zwei Monate nach einem Infarkt war jedoch im Mausmodell die Aktivität der Akt-Achse deutlich reduziert und die Myostatin-Achse weiterhin aktiv (84). Der hemmende Einfluss von Myostatin auf die p38 MAP-Kinase und Akt ist schwächer ausgeprägt als die stimulierende Wirkung, die beispielsweise IGF-1 hierauf ausübt (82, 83). Dennoch gewinnt der Weg eine gewisse Zeit nach dem Herzinfarkt im Skelettmuskel die Oberhand. Verantwortlich dafür könnten hinzukommende wachstumshemmende oder aber der Wegfall oder die Inhibition wachstumsstimulierender Signalwege sein.

Auch eine Rekrutierung des Myostatin-Weges durch andere bei Herzinsuffizienz relevante Mediatoren ist nachgewiesen. Eine vermehrte Expression wird über inflammatorische Zytokine wie TNF α induziert, konnte jedoch auch mit adrenerger Stimulation und der Wirkung von Angiotensin II in Verbindung gebracht werden (120, 157, 158). Da Myostatin die Effekte von Angiotensin II auf die Proteinsynthese hemmt, könnte es hier die Rolle einer negativen *Feedback*-Regulation übernehmen (157, 159).

1.2.6 Angiotensin-Achse

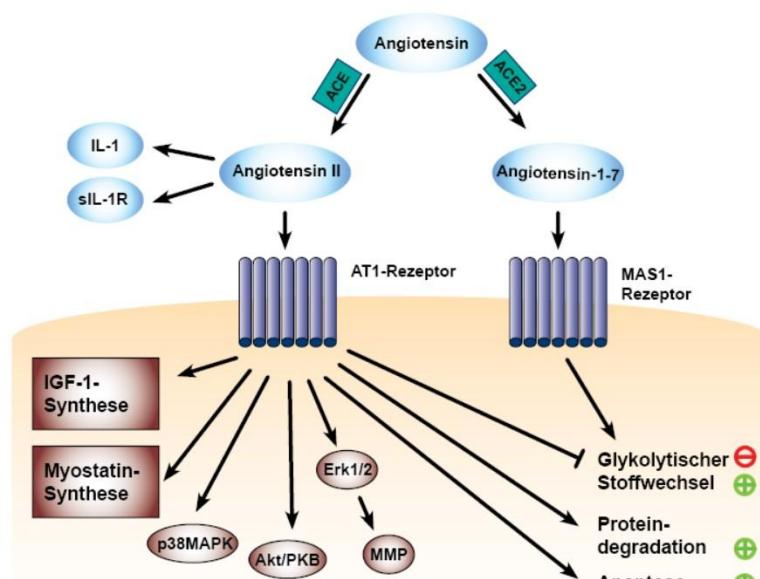


Abb. 1.2.8 Angiotensin-abhängiger Signalweg. Angiotensin wird entweder vom *Angiotensin-converting-Enzyme* (ACE) zu Angiotensin II oder durch das *Angiotensin-converting-Enzyme 2* (ACE2) zu Angiotensin 1-7 umgesetzt. Angiotensin II stimuliert Interleukin 1 (IL-1) und den löslichen IL-1-Rezeptor (sIL-1R). Zudem bindet es an den Angiotensin 1-Rezeptor (AT1-Rezeptor). Dieser stimuliert die *Insuline-Like-Growth-Factor-1* (IGF-1)-Synthese sowie die Myostatin-Synthese. Zudem stimuliert er die p38-Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (p38MAPK), die Proteinkinase B α (Akt/PKB) sowie über die *Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1/2* (ERK 1/2), die Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP). Er hemmt den glykolytischen Stoffwechsel und stimuliert die Proteindegradation und Apoptose. Angiotensin-1-7 bindet an den Massey1-Rezeptor (MAS1-Rezeptor), der seinerseits den glykolytischen Zellstoffwechsel stimuliert

Es ist bekannt und von therapeutischer Relevanz, dass die Aktivität der Angiotensin-Achse bei Herzinsuffizienz erhöht ist (104, 105, 119). Am Herzmuskel wird über Angiotensin-Rezeptor 1 (AT1-Rezeptor) eine Herzmuskelhypertrophie induziert und systemisch führt Angiotensin II zu einer Unterdrückung von IGF-1 und kann Muskelschwäche und Gewichtsverlust bewirken (81, 159, 160).

Angiotensin induziert im Skelettmuskel den Abbau von Proteinen, fördert die Apoptose und greift in den Zellstoffwechsel ein. Es steigert über eine erhöhte Expression von Ubiquitin-Ligasen die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität und erhöht die Expression von Proteinen im Apoptose-Signalweg (81, 161–163). Die Aktivierung dieser Signalwege im Skelettmuskel durch Angiotensin konnte bereits im Zusammenhang mit einer Herzinsuffizienz gezeigt werden (119). Es induziert im Herzen

außerdem Erk1/2 und dadurch die Expression von Matrix-Metalloproteasen (164, 165). Dennoch erhöht es gleichzeitig auch die Akt-Phosphorylierung und die der p38 MAP-Kinase (157, 159).

Für die Eingriffe in den Zellstoffwechseln ist das Verhältnis der Aktivität der Angiotensin (AT)– AT-konvertierendes-Enzym (ACE)-Angiotensin II (ATII)-Angiotensinrezeptor (ATR)-Achse zu der der AT-ACE2-Angiotensin 1-7 (AT1-7)-Mas-Rezeptorachse (MasR) entscheidend, die sich hier antagonisieren (166). Während die AT-ACE-ATII-ATR-Achse mit einer Insulinresistenz assoziiert ist, steigert die AT-ACE2-AT1-7-masR-Achse die skelettmuskuläre Glucoseaufnahme und fördert gleichzeitig den Wechsel hin zu glykolytischen Muskelfasern (119, 166).

Am Herzen fördert die Wirkung von Angiotensin II insgesamt die Hypertrophie im Skelettmuskel induziert es hingegen Atrophie. Die im Herzen induzierte Hypertrophie, die Steigerung der Aktiven und die Reduktion der passiven Kraft sind auf eine vermehrte Akt-Aktivität und eine veränderte Aktivität der Proteinkinase C (PKC) zurückzuführen (81, 159, 167). Im Skelettmuskel reduziert es die IGF-1-Expression, was auch eine Muskelschwäche bewirkt (81, 162) (siehe Abb. 1.2.8). Die Ursache dieser unterschiedlichen Wirkung auf beide Gewebe ist noch unklar, könnte jedoch mit der Ausgangsexpression von Bestandteilen unterschiedlicher Signalwege zusammenhängen.

Angiotensin stimuliert zudem noch andere Achsen, die im Zusammenhang mit einer Muskelatrophie stehen. So stimuliert es wie bereits oben beschrieben die Myostatin-Expression, was wiederum die Angiotensin-vermittelten Effekte auf die Expression hemmt und als negatives *Feedback* fungieren könnte (157, 159). Außerdem erhöht es bei Herzinsuffizienz-Patienten die Serumspiegel von IL-6 und dessen löslichen Rezeptor (138).

Ob die vermehrte Aktivierung der Angiotensin-Achse bereits vor dem Einsetzen einer funktionalen Herzinsuffizienz wie als Folge einer akuten Myokardischämie auftritt und an dessen Entwicklung beteiligt ist, oder aber eine erst im Rahmen der Herzinsuffizienz hochreguliert wird, ist noch unklar. Es scheint jedoch bereits bei der myokardialen Narbenbildung nach einer Ischämie eine Rolle zu spielen (168).

1.2.7 Neurogene/ neurohumorale Signalwege

Ein weiterer nennenswerter Einfluss auf die Muskelfunktion bei Herzerkrankungen ist die Aktivität neuronaler beziehungsweise neurohumoraler Einflüsse, insbesondere durch das adrenerge System.

Bei kachektischen Herzinsuffizienzpatienten finden sich erhöhte Adrenalin- und Noradrenalinspiegel (122). Im Rahmen einer krebserkrankten Kachexie konnte gezeigt werden, dass über Adrenorezeptoren im Skelettmuskel das Ubiquitin-Proteasom-System und Apoptose-Signalwege in ihrer Expression gesteigert werden (169). Am Herzen hingegen konnten Hypertrophie-induzierende Stimulationen der p38 MAP-Kinase und von Akt gezeigt werden (82, 160). Am Skelettmuskel wirkt eine Aktivierung der α -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins 2 ($G_{12\alpha}$)

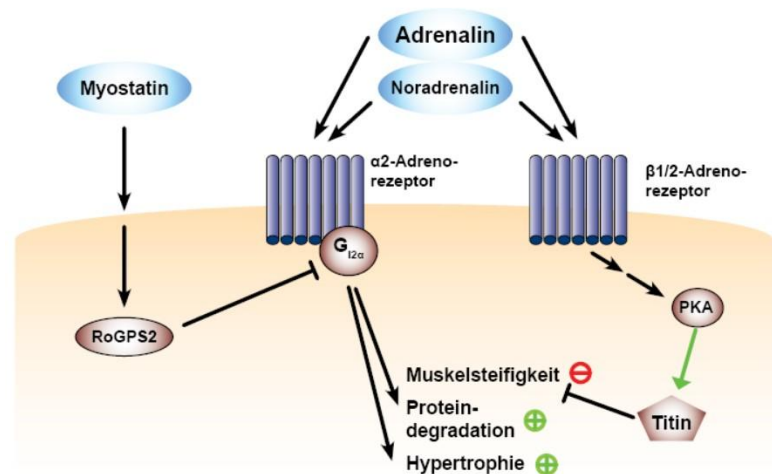


Abb. 1.2.9 Das adrenerge Signaling am Skelettmuskel. Myostatin stimuliert indirekt den *Regulator of G-Protein-Signaling 2* (RoGPS2), der kleine G-Proteine (dargestellt $G_{12\alpha}$) hemmt. Adrenalin und Noradrenalin binden an zelluläre Adrenorezeptoren. Der α_2 -Adrenorezeptor steigert über ein inhibitorisches kleines G-Protein die Protein-degradation und Hypertrophie. Die β -Adrenorezeptoren 1 und 2 (β_1/β_2 -Adrenorezeptor) stimulieren indirekt die Proteinkinase A (PKA), die Titin phosphoryliert, was die Muskelsteifigkeit reduziert

hypertroph und hemmt die Stimulation der Expression im Ubiquitin-Proteasom-System (170) (siehe Abb. 1.2.9).

Es konnte zudem in einem Modell mit erhöhtem Sympathikotonus gezeigt werden, dass es bei Mäusen zunächst zu einer Muskelhypertrophie und dann später zu einer Muskelatrophie kommt (171). Am Herzen ist bekannt, dass im Rahmen der Herzinsuffizienz die Expression von β -Adrenorezeptoren reduziert wird, während die Expression von $\alpha 1$ -Adrenorezeptoren unverändert bleibt (172, 173). Ob ein ähnlicher Mechanismus am Skelettmuskel eine Rolle spielt, ist unbekannt. Da Myostatin die Wirkung des $\alpha 1$ -Adrenorezeptors sowie gleichzeitig über die Stimulation des Regulators des G-Protein-Signalwegs 2 auch die β -Adrenorezeptor-Signalwege hemmt, könnte dies am Skelettmuskel die hypertrophen Effekte reduzieren (153, 174).

Von weiterem Interesse im Sinne dieser Arbeit ist, dass ein Einfluss der adrenergen Stimulation auf die Mechanik des Titin-Proteins bekannt ist. Am Herzen kommt es durch eine β -Adrenorezeptor-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zu einer Phosphorylierung sowohl der N2B-Titinisoform als auch der N2BA-Titinisoform (175–177). Diese Phosphorylierung reduziert die Steifigkeit des Proteins, wobei dieser Effekt bei der N2B-Isoform ausgeprägter zu sein scheint (175–177). Da diese Isoform jedoch herzspezifisch exprimiert wird (178), ist davon auszugehen, dass dieser Effekt am Skelettmuskel weniger stark ausgeprägt oder gar nicht vorhanden ist.

1.3 Zelluläre Signalwege

1.3.1 Übersicht

Nachdem im vorherigen Kapitel die systemischen Signalwege thematisiert wurden, denen eine Bedeutung bei der Vermittlung einer skelettmuskulären Muskelschwäche bei Herzinsuffizienz beziehungsweise nach Herzinfarkt zukommen könnte, näher betrachtet wurden, sollen nun die auf diesen Wegen angestoßenen zellulären Mechanismen direkt im Skelettmuskel betrachtet werden. Dabei liegt der Fokus auf den Signalwegen, die im Zusammenhang mit einer Atrophie, einer Muskelschwäche und der Titinmechanik stehen. In diesem Rahmen werden der mTOR-Akt-Weg, die Proteindegradation über das Ubiquitin-Proteasom-System und Autophagie, die Regulation der Apoptose, Unterschiede und Einflüsse in verschiedenen Muskelfasertypen, oxidativer Stress innerhalb der Zelle, den peroxisome proliferator-activated receptor Gamma coactivator 1 α (PGC1 α)-Weg, der Calciumhaushalt, die Proteinkinase C (PKC), die AMP-Kinase (AMPK) und zuletzt Einflüsse am Titinprotein selbst besprochen.

1.3.2 *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR)-Komplex

Der mTOR-Komplex hat eine zentrale Bedeutung in vielen zellulären Signalwegen insbesondere im Zusammenhang mit dem Zellwachstum und der Immunantwort. Er wird von Wachstumsfaktoren über die PI3-Kinase und Akt aktiviert (179, 180), fördert die Proteinsynthese und hemmt Apoptose und Autophagie (181–183). Der Weg ist für die physiologische Muskelhypertrophie entscheidend (183). Auch Erk1/2, Mitogen-aktivierte Kinase p70 ribosomale Kinase S6 (MAPKp70rKS6) und TNF α fördern die Aktivierung (180, 184, 185). Die AMPK hingegen hemmt die Aktivierung bei niedrigen zellulären Energieleveln (186, 187). Einige Signalstoffe haben einen Einfluss auf den Signalweg, indem sie die Akt-Aktivität beeinflussen. Apelin, Angiotensin II und TGF- β erhöhen die Akt-Aktivität, während Aktivin A sie hemmt und für Myostatin sowohl hemmende als auch stimulierende Wirkungen beschrieben wurden (81–84, 107, 109, 110, 188) (siehe Abb. 1.3.1).

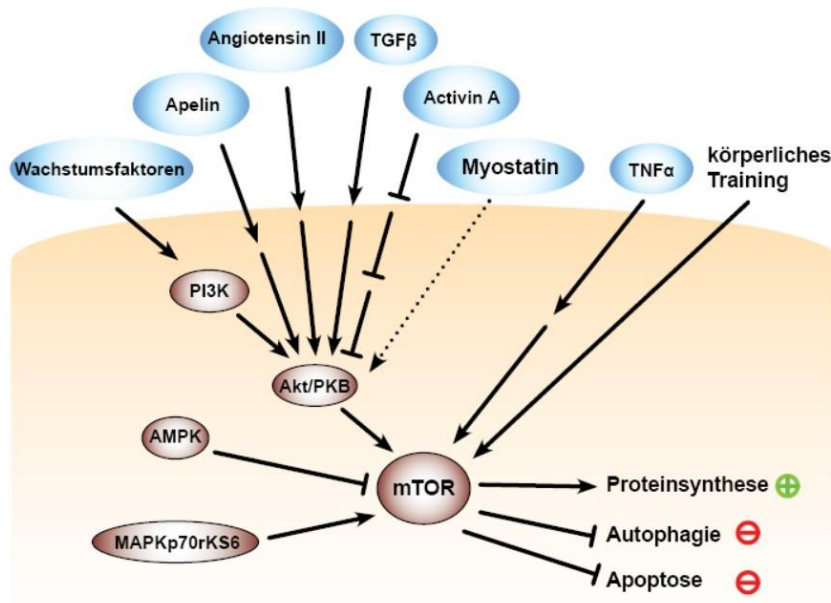


Abb. 1.3.1 mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Signaling. Wachstumsfaktoren stimulieren die Phospho-Inositol-3-Kinase, die ihrerseits die Proteinkinase B α (Akt/PKB) stimuliert. Diese wird zudem indirekt von Apelin, Angiotensin II und Tumor-Growth-Faktor β (TGF β) stimuliert und von Activin A indirekt gehemmt. Sie selbst stimuliert mTOR. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und körperliches Training stimulieren mTOR indirekt. Intrazellulär wird mTOR von der Adenosin-Monophosphat-abhängigen Kinase (AMPK) gehemmt und von der Mitogen-aktivierten Kinase p70 ribosomale Kinase S6 (MAPKp70rKS6) stimuliert. Es fördert die Proteinsynthese und hemmt die zelluläre Autophagie und Apoptose

Die Regulation des mTOR-Signalwegs bei Muskelatrophie ist uneindeutig. Auch wenn man intuitiverweise im Rahmen einer Atrophie zunächst eine verminderte Rekrutierung des Signalweges vermuten würde, wurde sowohl eine reduzierte als auch in einem Fall eine erhöhte Aktivität bei altersbedingter Sarkopenie gefunden (132, 189, 190). In letzterem Fall erwies sich sogar eine Hemmung des Weges als förderlich für die Muskelfunktion (132, 189). Da allerdings mTOR in vielen Zellen und Systemen eine Rolle spielt, ist unklar, ob der therapeutische Effekt auf die Hemmung von mTOR im Muskel oder in einem anderen Gewebe zustande kam. Unterstrichen wird dies von dem Befund, dass eine komplette Blockade des mTOR-Weges ebenfalls zu einer Atrophie führt (191). In einer Studie zum Einfluss

von aerobem körperlichen *Training* bei Herzinsuffizienz konnte gezeigt werden, dass das *Training* den mTOR-Weg im Skelettmuskel nicht wie beim Gesunden induzieren kann (192). Untersuchungen zum grundsätzlichen Aktivitätsniveau des mTOR-Weges im Skelettmuskel bei Herzerkrankung stehen noch aus. Da er aber wie oben beschrieben bei verwandten Krankheitsbildern von Relevanz ist und durch Wachstumsfaktoren, Hormone und inflammatorische Zytokine beeinflusst wird, die alle ihrerseits von Herzerkrankungen verändert werden, ist eine Bedeutung in diesem Zusammenhang naheliegend. Zudem ist bekannt, dass die insulinabhängige Aktivierung von mTOR das Titin-RNA-*Splicing* direkt beeinflusst, was seinerseits bei Diabetes mellitus beeinträchtigt ist (193).

1.3.3 Calcium-Calmodulin-Calcineurin-nuclear factor of activated T-cells (NFAT)-Achse

Auch die Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Achse hat eine große Bedeutung in der Regulation des Zellwachstums und des Zellstoffwechsels. Sie spielt eine Rolle in der Hypertrophieregulation des Skelettmuskels durch IGF-1 und α -adrenerge Stimulation (74, 170, 183, 194, 195).

Dabei bindet Calcium an Calmodulin, das die Calmodulinabhängige Kinase (CaMK) aktiviert, welche *Rat Sarcoma Protein* (Ras) enthemmt, welches Mitogen-aktivierten Kinasen K 1 und 2 (MEK1/2) aktiviert, welche ERK1/2 aktivieren (195–198). Gleichzeitig aktiviert Calmodulin auch Calcineurin, welches den Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor of activated T-cells* (NFAT) aktiviert (199, 200). Zudem aktiviert Calmodulin eine Calcium-Efflux-Pumpe, im Sinne eines negativen Feedbacks (201).

Die CamK-Kaskade und die AMPK-Kaskade agieren synergistisch und aktivieren sich gegenseitig (202, 203). ERK1/2 hemmt den *Forkhead-Box-Protein* O3 (FoxO3) -Transkriptionsfaktor und damit vermeintlich die Expression von Ubiquitinligasen (204). Dies könnte die hypertrophiefördernden Effekte des Signalweges teilweise erklären. Dennoch bewirkt Calpacin 3, eine Protease, die ebenfalls durch Calmodulin aktiviert wird, einen Abbau des Sarkomerproteins Titin (205).

Darüber hinaus spielt der Signalweg auch bei der Regulation der Fasertypen eine Rolle. Die Aktivierung der Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Achse fördert die Expression von langsamen, oxidativen Typ I Fasern, während eine Inhibition die Bildung schneller, glykolytischer Fasern fördert (206–208) (siehe Abb. 1.3.2).

Im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen ist von Relevanz, dass Calcineurin NF κ B aktiviert. (209–211) Die vermehrte Aktivität dieses Signalwegs in langsamen, oxidativen Typ I-Fasern könnte ihre erhöhte Empfindlichkeit gegenüber inflammatorischen Signalen und ihre Reduktion im Rahmen der Herzinsuffizienz erklären (212–214). Kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zudem zu vermehrtem oxidativem Stress, könnte dies zu einer vermehrten Aktivierung der calciumaktivierten Signalwege führen, denn es wurde beobachtet, dass im Herzen über den *microtubules dependent reactive oxygen species*- (X-ROS)-Signalweg bei Dehnung der Calciumstrom erhöht wird (215).

1.3.4 Proteindegradation und Apoptose

Bei Herzinsuffizienz kommt es im Skelettmuskel zu einer gesteigerten Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems und zu vermehrter Apoptose-Induktion (78, 94, 119, 171, 213, 216, 217). Interessanterweise konnte eine Untersuchung der generellen zellulären Proteindegradation bei Sarkopenie hier keine Veränderungen nachweisen (218). Allerdings ist physiologischerweise im Alter die muskuläre Proteinsynthese und Aminosäuretransporter-Expression reduziert (219).

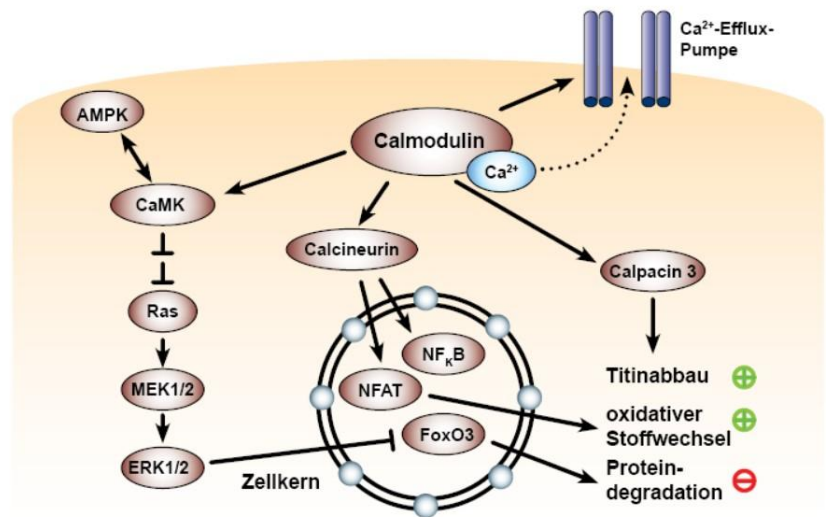


Abb. 1.3.2 Calciumabhängiges zelluläres Signaling. Intrazellulär binden Calcium-Ionen (Ca²⁺) an Calmodulin. Dieses aktiviert eine Calciumionen-Efflux-Pumpe (Ca²⁺-Efflux Pumpe). Intrazellulär aktiviert es zudem die die Calmodulinabhängige Kinase (CaMK), welche das *Rat Sarcoma Protein* (Ras) enthemmt, welches die Mitogen-aktivierten Kinasen K 1 und 2 (MEK1/2) aktiviert, welche die *Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1 und 2* (ERK 1/2) aktivieren. Letztere hemmen den intranukleären Transkriptionsfaktor *Forkhead-Box-Protein* O3 (FoxO3), der seinerseits die Proteindegradation stimulieren würde, die somit also insgesamt verminder wird. Zudem aktiviert Calmodulin Calcineurin, das den *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) aktiviert, die im Skelettmuskel den oxidativen Stoffwechsel anregen. Zusätzlich aktiviert Calmodulin auch Calpacin 3, welche den Titinabbau fördert

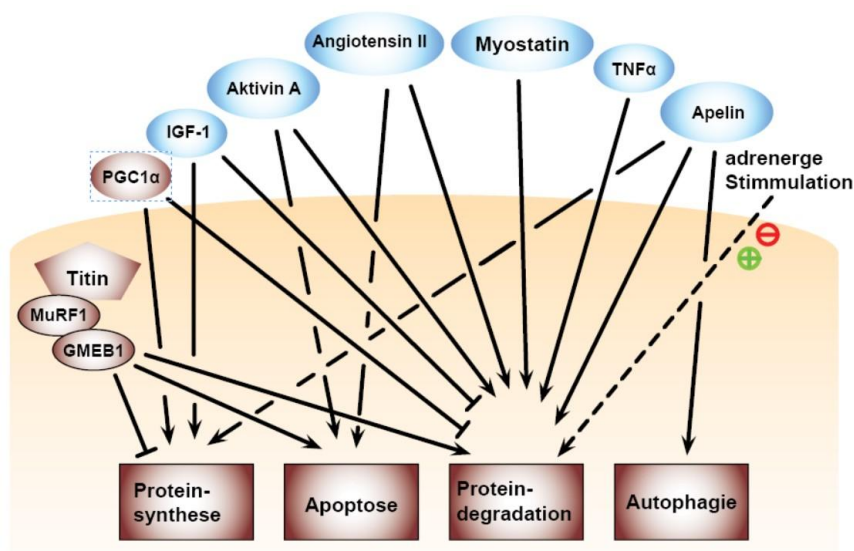


Abb. 1.3.3 Signalstoffe in der Muskelregulation. Titingebundenes *muscle RING-finger protein-1* (MuRF1), rekrutiert den Transkriptionsfaktor *Glucocorticoid modulatory element binding Protein* (GMEB-1), der die Proteinsynthese hemmt und die Apoptose sowie Proteindegradation stimuliert. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC1 α) sowie der Wachstumsfaktor Insulin-like-Growth-Factor 1 (IGF-1) stimulieren die Proteinsynthese und hemmen die Proteindegradation. Aktivin A und Angiotensin II stimulieren die Apoptose und fördern die Proteindegradation. Myostatin, der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Apelin stimulieren die Proteindegradation, während Apelin zusätzlich auch die Proteinsynthese und die Autophagie stimuliert. Adrenerge Signale beeinflussen ebenfalls die Proteindegradation, in welcher Weise ist noch nicht geklärt

Ubiquitinligasen, insbesondere *muscle RING-finger protein-1* (MuRF1), sind für die physiologische Funktion des Herz- und Skelettmuskels notwendig und am Abbau von Sarkomerproteinen beteiligt (218, 220–225). Spezifische Ziele dessen sind Myosin und Titin, wobei zudem bereits ein Abbau von Myosin im Skelettmuskel im Zusammenhang mit einem Herzinfarkt gezeigt werden konnte (78, 226). MuRF1

bindet dabei Titin an einer spezifischen Stelle in der M-Linie und ist an der Stabilisierung der Sarkomerstruktur beteiligt und rekrutiert unter anderem das *Glucocorticoid modulatory element binding Protein 1* (GMEB-1), einen Transkriptionsfaktor (32, 227, 228). Dieser Komplex ist wesentlich für die Induktion von Apoptose, die Aktivität

des Ubiquitin-Proteasom-Systems und die Reduktion der Proteinsynthese in Rahmen der Skelettmuskelatrophie bei Herzinsuffizienz (33).

Für unterschiedliche Signalstoffe mit Relevanz im Rahmen der Herzinsuffizienz konnte die Induktion eines Proteinabbaus, eine Induktion von Autophagie oder der Apoptose nachgewiesen werden (siehe Abb. 1.3.3). Apelin induziert Gene, die im Zusammenhang mit dem Ubiquitin-Proteasom-System und der Autophagie stehen, auch wenn die anabolen Effekte zu überwiegen scheinen (107, 117, 229). Auch TNF α , Myostatin und Aktivin A induzieren die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und Aktivin A wirkt zudem proapoptotisch (83, 170, 188, 230, 231). Angiotensin induziert ebenfalls das Ubiquitin-Proteasom-System bei gleichzeitiger Hemmung der Expression antiapoptotischer Proteine (81, 119, 163). IGF-1 und PGC1 α scheinen die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems zu hemmen (78, 232). Eine Hemmung der adrenergen Stimulation hemmt die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (158). Da zudem gezeigt wurde, dass im Modell eine sympathische Stimulation zunächst zu einer Muskelhypertrophie und erst später zu einer Atrophie führt (171), lässt sich vermuten, dass sich die Patienten, bei denen eine Hemmung vorteilhaft war, bereits im zweiten Stadium befanden.

1.3.5 Veränderungen der Muskelfasertypen

Für die Funktion und den Stoffwechsel eines Muskels sind die dort vorherrschenden Fasertypen von entscheidender Bedeutung. Man unterscheidet hierbei zwischen Typ I, Typ IIA, Typ IIB und Typ IIX-Fasern, wobei auch Mischformen vorkommen, die jeweils spezifische Expressionsmuster insbesondere der Myosin-Schweren-Ketten (MHC) aufweisen (233–235). Die Faserzusammensetzung eines Muskels ist zudem relativ spezifisch und steht in direktem Zusammenhang mit dessen Funktion.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Muskeln ergibt sich die folgende Zusammensetzung: Der Musculus psoas weist vornehmlich Typ IIB-Fasern, der Musculus, der Musculus tibialis anterior weist vornehmlich Typ IIA-Fasern, der Musculus gastrocnemius weist vornehmlich Typ IIB-Fasern, der Musculus soleus weist vornehmlich Typ I-Fasern und der Musculus extensor digitorum longus weist vornehmlich Typ IIA- und IIB-Fasern auf (7).

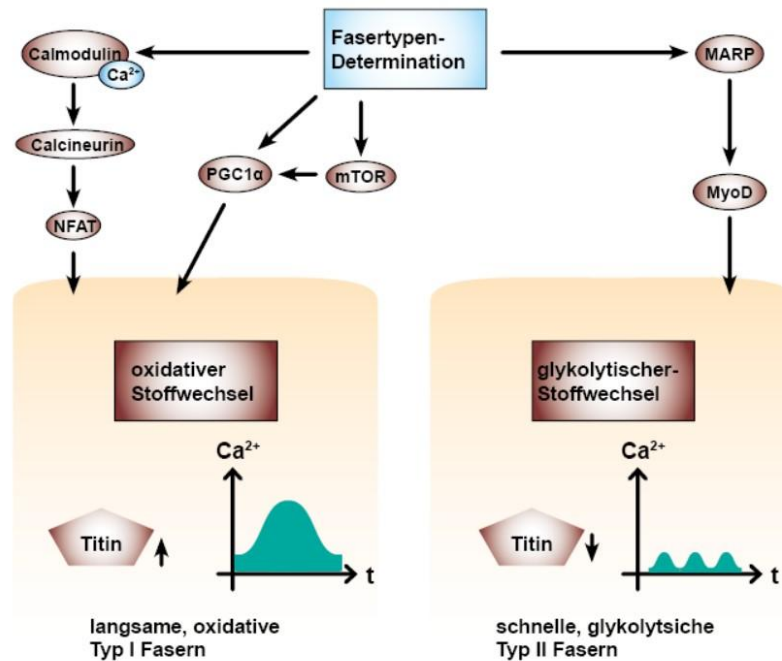


Abb. 1.3.4 Die Determination von Fasertypen und deren unterschiedlicher Stoffwechsel. Eine hohe Aktivität der Calcium-Calmodulin-Calcineurin-nuclear factor of activated T-cells (NFAT)-Achse fördert die Bildung von langsamen Typ I-Fasern mit vornehmlich oxidativem Stoffwechsel. Ebenso fördert proliferator-activated receptor γ Coactivator 1 α (PGC1 α) die Bildung von Typ I Fasern und kommt in dieser in erhöhter Konzentration vor. *Mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) stimuliert PGC1 α . Einige *Muscle ankyrin repeat*-Proteine (MARPs) stimulieren die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Myogener Faktor 3 (MyoD), der für die Induktion schneller, glykolytischer Typ II Fasern notwendig ist. In Typ I Fasern liegt eine höhere Titinkonzentration vor als in Typ II Fasern. Zudem besitzen Typ I Fasern ein langsames Calcium (Ca²⁺)-Signaling bezogen auf die Zeit (t) mit langsamerem Ein- und Ausstrom jedoch höheren Spitzen- und Durchschnittskonzentrationen

Inhibition die Bildung schneller, glykolytischer Fasern fördert (206–208). Auch *Muscle ankyrin repeat-Proteine* (MARPs) wie *Cardiac ankyrin repeat protein* (CARP), *Diabetes Related Ankyrin Repeat Protein* (DARP) und *Ankyrin repeat domain-containing protein 2* (Ankrd2/Arpp) nehmen Einfluss auf die Fasertypenexpression, indem sie die Wirkung des für die Induktion von schnellen Fasern notwendigen Transkriptionsfaktors Myogener Faktor 3 (MyoD) steigern (244–246).

Ein weiterer wichtiger Signalweg in der Regulation des Muskelfaserstoffwechsels ist das Signalprotein *Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator 1 α* (PGC1 α). Seine Aktivität ist ebenfalls bei Herzinsuffizienz, bei Sarkopenie und im Alter reduziert (132, 192, 232, 247). Es ist an der Bildung von Typ I Fasern beteiligt, in denen sein Spiegel erhöht ist (232, 248). Daber bewirkt er eine vermehrte Expression von Proteinen des oxidativen Stoffwechsels, Myoglobin und eine gesteigerte Mitochondriogenese (232, 248). Gleichzeitig verändert es auch das zelluläre Calciumfreisetzungsprofil, sodass die maximale Calciumfreisetzung reduziert wird, jedoch auch gleichzeitig die Mechanismen zur Calciumelimination aus dem Cytosol, sodass es zu einem

Typ I Fasern haben einen vornehmlich oxidativen Stoffwechsel, enthalten viel Myoglobin, viele Mitochondrien, einen hohen PGC1 α -Spiegel, ein kleineres sarkoplasmatisches Retikulum und generieren auch bei längerer Stimulation gleichbleibende Kraft (236–241). Typ IIA, IIX und in noch ausgeprägterer Form IIB-Fasern generieren schnell Kraft, sind vorwiegend glykolytisch, reagieren stärker auf den Insulin-Signalweg und ermüden rasch (232, 236–241). Langsame, oxidative Fasern haben kürzere Aktinfilamente, generieren eine geringere maximale Kraft, haben einen höheren Titingehalt und eine größere passive Kraft bei Dehnung als schnelle Fasern (242, 243).

Die Fasertypen-Expression ist wesentlich von der Innervation abhängig (239), was vornehmlich durch die Aktivität der Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Achse gesteuert wird. Diese fördert wie oben beschrieben das Expressionsmuster oxidativer Typ I Fasern, während eine

insgesamt höheren Calciumspiegel über eine längere Dauer kommt (249) (siehe Abb 1.3.4). Derartige Veränderungen wurden im Skelettmuskel teilweise nach Herzmuskelischämie beschrieben (250). Das veränderte Calciumfreisetzungsprofil könnte seinerseits die calciumabhängigen Signalwege beeinflussen, die wie oben beschrieben teilweise auch ihrerseits Einfluss auf den Fasertypen nehmen.

Gleichzeitig spielt PGC1 α eine Rolle bei der physiologischen Hypertrophie der Muskulatur und reduziert die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (192, 232, 247). Es wird von mTOR aktiviert und vermittelt dessen Wirkung auf die Mitochondriogenese (251).

Bei Herzinsuffizienz-Patienten konnte ein verändertes Skelettmuskelfaser-Muster beobachtet werden. Während weniger langsame, oxidative Typ I-Fasern vorlagen, war der Anteil an schnellen, glykolytischen Typ IIA, Typ IIB und Typ IIX-Fasern erhöht (212–214). Für diesen Effekt scheint die AT-ACE-ATII-Achse relevant zu sein, da eine Hemmung die Veränderung verminderte (119).

Zudem ist im Alter in oxidativen Muskeln die mitochondriale Koppulungseffizienz vermindert, bei erhöhter Expression von Atmungsketten-Proteinen und einer vermehrten Aktivierung der mTOR-Akt-Achse und der p70SK-6 Kinase (190, 252–255). In schnellen-glykolytischen Muskeln ist ebenfalls die Aktivität der p70SK-6 Kinase erhöht und zusätzlich die der AMPK (190). Zudem konnten Veränderungen des oxidativen Phänotyps der Muskulatur sowohl mit einer systemischen Entzündungsreaktion, als auch mit einer Insulinresistenz beziehungsweise dem metabolischen Syndrom in Zusammenhang gebracht werden (142). Diese Veränderungen könnten sich also im klinischen Bild mit Veränderungen, die ursächlich auf die Herzinsuffizienz zurückzuführen sind überschneiden.

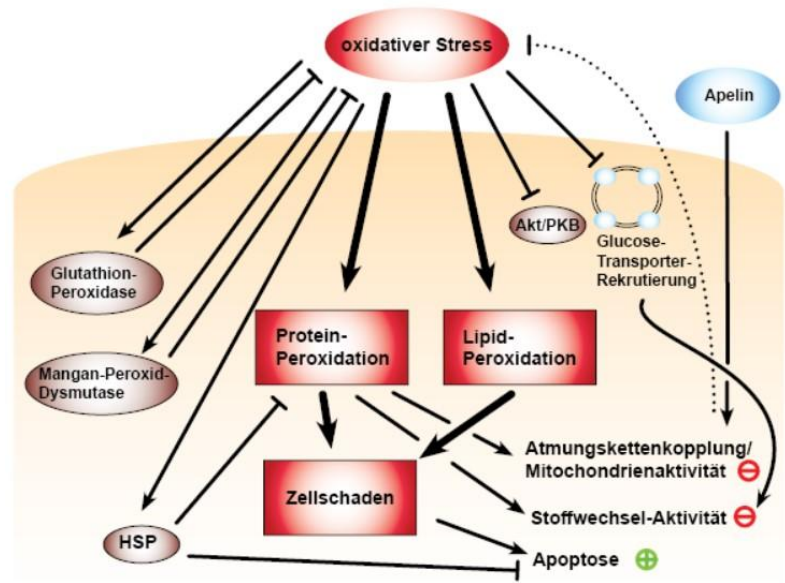
Im Zusammenhang mit Signalwegen im Rahmen der Herzinsuffizienz, ist insbesondere zu nennen, dass Apelin die Bildung von Typ I-Fasern, die Vermehrte Expression von Atmungskettenproteinen und Mitochondrienzymen sowie deren Aktivität stimuliert (107, 111). In einem Modell mit Apelin-defizienten Mäusen zeigte es sich jedoch auch an der Bildung von Typ IIB und IIX-Fasern beteiligt (107). Da der Spiegel bei Herzinsuffizienz reduziert ist (106), könnte dies womöglich den Zusammenhang von Herzinsuffizienz und der Verminderung der Typ-I-Fasern begründen.

1.3.6 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress kann in Zellen zu wesentlichen Schäden führen. Er kommt jedoch im Skelettmuskel physiologischerweise bei der Kontraktion vermehrt vor und ist an der Ermüdung des Muskels beteiligt (256). Er reduziert die hypertrophiefördernde Akt-Aktivierung und die Rekrutierung von Glucosetransportern im Skelettmuskel (71). Eine verschlechterte Toleranz gegenüber oxidativem Stress könnte also die mechanische Funktionsfähigkeit des Muskels beeinträchtigen. Insbesondere vor den oben beschriebenen Veränderungen der oxidativen Kapazität der Skelettmuskulatur bei Älteren könnte diesem Einfluss eine besondere Rolle zukommen.

Tatsächlich steigt im Rahmen einer Herzerkrankung der oxidative Stress im Skelettmuskel und in Folge dessen kommt es zu Zellschäden durch eine gesteigerte Lipidperoxidation (71, 171, 257). Hierbei sind die Mitochondrienfunktion und die Atmungskettenkopplung reduziert, was womöglich zum erhöhten oxidativen Stress beiträgt, während vermehrt Glutathion-Peroxidase und Mangan-Peroxid-Dismutase gebildet werden, welche dem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) dienen (214, 217, 257). Ähnliche Veränderungen finden sich auch im Herzmuskel selber, wo ein Zusammenhang des oxidativen Stresses mit einer Herzhypertrophie, einer verschlechterten Funktion und einer vermehrten Fibrose gezeigt werden konnte (258, 259). Am Herzen scheint der oxidative Stress sowohl durch Veränderungen der Mitochondrienfunktion als auch durch ein mikrotubulusabhängigen Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase 2(NOX2)-ROS-Signalweg bedingt zu sein (215). Auch bei der altersbedingten Sarkopenie findet sich eine verminderte Mitochondrienfunktion im Skelettmuskel (132).

Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die Zellen vor oxidativem Stress schützen. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die *Heat shock* Proteine (HSP). Sie werden unter anderem direkt durch oxidativen Stress induziert, schützen andere Proteine durch Bindung vor der Denaturierung durch ROS und hemmen die Apoptose (260–262). Auch das Titinprotein wird durch HSP geschützt und stabilisiert. Das *Heat shock* Protein 27 (HSP27) bindet gemeinsam mit α B-Cristallin an die Ig-Region von Titin (263, 264). Auch für das



Heat shock Proteine 90 (HSP90) konnte eine Bindung von Titin gezeigt werden (265) (siehe Abb. 1.3.5). Dies schützt das Protein und die Sarkomerstruktur vor einer Assoziation unterschiedlicher Titinfilamente untereinander im Rahmen vom Zellstress, was die Steifigkeit erhöhen würde (263, 264). Bei altersbedingter Sarkopenie konnte eine verminderte Expression von bestimmten HSP nachgewiesen werden (108).

Abb. 1.3.5 Der Einfluss von oxidativem Stress auf den Skelettmuskelstoffwechsel. Oxidativer Stress stimuliert die Aktivität der Glutathion-Peroxidase und Mangan-Peroxid-Dismutase, die durch ihre Aktivität beide ihrerseits oxidativen Stress reduzieren. Es stimuliert zudem die Protein- und Lipid-Peroxidation sowie die *Heat Shock Proteine* (HSP), die die Protein-Peroxidation reduzieren und die Apoptoseeinleitung hemmen. Es hemmt zudem die Proteinkinase Ba (Akt/PKB) und die Glucose-Transporter-Rekrutierung, was insgesamt die Stoffwechselaktivität herabsetzt. Apelin stimuliert unabhängig davon die Mitochondrienaktivität und Atmungskettenkopplung. Die durch oxidativen Stress verursachte Protein- und Lipidperoxidation führt zu allgemeinen Zellschäden, die ihrerseits die Apoptose begünstigen. Die Proteinperoxidation reduziert zudem die Atmungskettenkopplung sowie die Mitochondrienaktivität und die zelluläre Stoffwechselaktivität

Analog zu seinem förderlichen Einfluss auf die Bildung von Typ I Fasern, erhöht Apelin die oxidative Kapazität und Mitochondrienaktivität im Skelettmuskel (107, 111). Daher könnte Apelin den oxidativen Stress potentiell senken, und seine reduzierten Spiegel (106) den vermehrten oxidativen Stress im Skelettmuskel bei Herzerkrankung teilweise erklären.

1.3.7 Proteinkinase C α

Ein weiteres Protein mit zentraler Bedeutung in der Regulation des Stoffwechsels und der Funktion von Skelettmuskelzellen ist die Proteinkinase C α (PKC α), deren Aktivität und Expression im Modell dieser Arbeit untersucht werden. Für ihre Aktivierung ist zunächst eine regulatorische Phosphorylierung durch eine andere Kinase nötig, die dann in Gegenwart der Coaktivatoren Calcium und Phosphatidylserin eine Autophosphorylierung von Serin 660 auslösen, was die Kinase in ihre aktive Form überführt (266–272). Sie aktiviert ihrerseits Erk1/2 (273) und NF κ B (209, 211).

PKC α beeinflusst wesentlich die Muskelmechanik. Es liegen kontroverse Ergebnisse darüber vor, ob es die aktive Kraft und Calciumsensitivität im Skelettmuskel steigert oder hemmt (13, 274–276). Dafür können möglicherweise Kreuzreaktionen mit Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A (PKA) verantwortlich gemacht werden (275). Die passive Muskelmechanik am Herzen wird durch eine Phosphorylierung der elastischen PEVK-Region im Titinprotein an Serin 11878 und Serin 12022 beeinflusst (16, 17) (siehe Abb. 1.3.6). Die Phosphorylierung in diesem Bereich erhöht die passive Steifigkeit (16, 17). Da die PEVK-Region auch im Skelettmuskel exprimiert wird, könnte die PKC auch hier im Rahmen der IR-Behandlung die Steifigkeit potenziell erhöhen.

In einem Herzinsuffizienzmodell konnte die reduzierte aktive Kraft des Herzens durch eine Antagonisierung der PKC mit der Proteinphosphatase 1 erhöht werden (13). Hiermit korrespondiert die Beobachtung, dass die PKC am Herzen die Myosin-



Abb. 1.3.6 Regulation und Funktion der Proteinkinase C α (PKC). Adrenalin und Noradrenalin binden am α 1-Adrenorezeptor, welcher über ein kleines Gq-Protein die PKC aktiviert. Myostatin bindet den Activin-Rezeptor IIB, der indirekt den Regulator of G-Protein-Signaling 2 (RoGGS2) aktiviert, der das G1-Protein hemmt und damit die PKC-Aktivierung vermindert. Angiotensin II bindet den Angiotensin Rezeptor 1 (AT1-Rezeptor), der indirekt die PKC-Aktivität steigert. Die PKC aktiviert sich selbst bei Bildung von Phosphatidylserin und Calcium (Ca^{2+}). Sie hemmt die *Sarcoplasmatic reticulum Calcium ATPase* (SERCA), die Calcium aus dem Sarkoplasma in das sarkoplasmatische Retikulum exportiert. Sie hemmt die Myosin-Leichte-Ketten-Kinasen-Aktivität (braun dargestellt) im Sarkomer und reduziert die Muskelsteifigkeit durch eine Phosphorylierung der PEVK-Region von Titin (blau/schwarz dargestellt). PKC stimuliert zudem den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* ($\text{NF}_{\kappa\text{B}}$) und die *Extracellulär-Signal-Regulierten Kinasen 1 und 2* (ERK 1/2)

Apelin bekannt. Die PKC α wird durch eine α 1-adrenerge Stimulation aktiviert. Da bei der Herzinsuffizienz die Adrenalinspiegel erhöht sind und es zumindest am Herzen nicht zu einer Herunterregulation der α 1-Rezeptoren kommt (122, 173, 278), könnte dies zu einer vermehrten Aktivität bei Herzinsuffizienz führen. Auch die Angiotensin-Achse aktiviert PKC α im Herzen über den AT-1-Rezeptor (279). Myostatin hemmt die PKC α -Aktivierung über den Regulator of G-Protein-Signaling (153, 154). Zudem ist die PKC an der insulinabhängigen Verstärkung der Apelin-Bildung beteiligt (115).

1.3.8 Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase (AMPK)

Auch die Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase (AMPK) ist ein wichtiger Regulator für den Muskelzellstoffwechsel (280) und wird ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit am Modell im Skelettmuskel untersucht. Sie kommt in zwei synergistisch agierenden Formen, die sich in ihrer Untereinheitenzusammensetzung unterscheiden, vor: einerseits als AMPK- α 1, die im Skelettmuskel vornehmlich eine Hypertrophie hemmt, und andererseits als AMPK- α 2, die vornehmlich eine Atrophie begünstigt (280). Physiologischerweise wird sie in Antwort auf eine hohe Adenosin-Monophosphat (AMP) bzw. Adenosin-Diphosphat (ADP)-Konzentration relativ zur Adenosin-Triphosphat (ATP)-Konzentration in der Zelle aktiviert und agiert so als Sensor für Energiemangel in der Zelle (281, 282). Im Skelettmuskel geschieht dies typischerweise im Rahmen von Muskelkontraktionen (283–285).

Adenosintriphosphat-abhängige Kinase (ATPase) Rate reduziert (276) und die *Sarcoplasmatic reticulum Calcium ATPase* (SERCA)-Aktivität reduziert, was die Calciumspeicherwirkung des endoplasmatischen Reticulums verringert (277). Tatsächlich konnte bei Herzinsuffizienz eine verminderte SERCA-Aktivität beobachtet werden (250).

Ein Einfluss auf die passive Muskelmechanik bei Herzinsuffizienz konnte am Herzen gezeigt werden. Hier ist die PKC-Expression und Aktivität initial unverändert, jedoch im Verlauf der Erkrankung erhöht (12, 13). Sie erhöht die Fasersteifigkeit durch eine erhöhte Phosphorylierung von Titin in der elastischen PEVK-Region an Serin 11878, während die Phosphorylierung an Serin 12022 scheinbar vermindert ist (14, 15).

Im Zusammenhang mit Signalwegen im Rahmen einer Herzinsuffizienz sind Verbindungen zu Effekten adrenerger Stimulation, der Angiotensinachse, Myostatin und

Zusätzlich kann sie durch eine Phosphorylierung von Threonin 172 in ihrer Aktivität gesteigert werden, was klassischerweise durch die AMPK-Kinase geschieht (286).

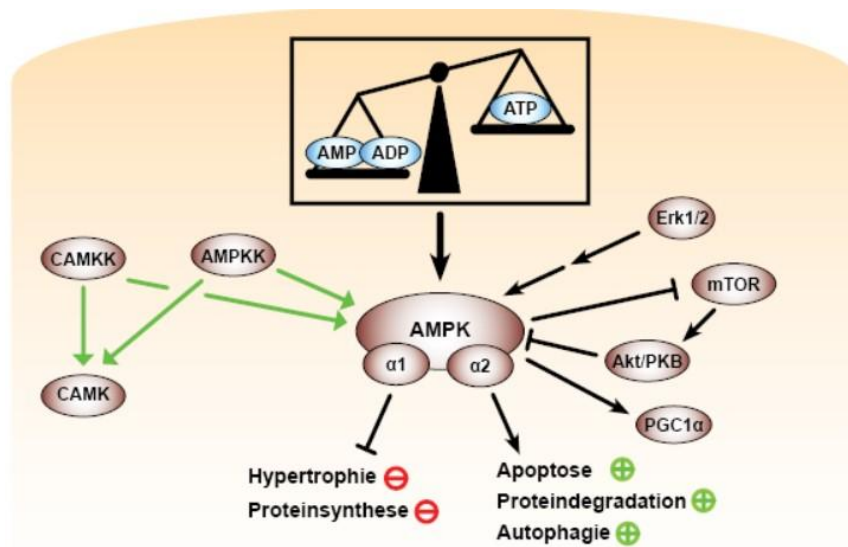


Abb. 1.3.7 Aktivität und Regulation Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase (AMPK). Die Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase wird bei einer Verschiebung des Verhältnisses von Adenosin-Monophosphat (AMP) und Adenosin-Diphosphat (ADP) zu Adenosin-Triphosphat (ATP) in Richtung der weniger phosphorylierten Varianten aktiviert. Sie unterteilt sich in zwei Subtypen, den Typen AMPK- $\alpha 1$ ($\alpha 1$) und AMPK- $\alpha 2$ ($\alpha 2$). Die AMPK- $\alpha 1$ hemmt vornehmlich die Muskelhypertrophie und Proteinsynthese. Die AMPK- $\alpha 2$ fördert die Apoptose, die Proteindegradation und die Autophagie. Die AMPK wird von der Adenosin-Monophosphat-abhängige Kinase Kinase (AMPKK) aktiviert. Es besteht eine Kreuzaktivierung durch die Calmodulin-abhängige Kinase-Kaskade, bei der die Calmodulin-abhängige Kinase Kinase (CAMKK) neben der Calmodulin-abhängige Kinase (CAMK) auch die AMPK aktiviert und gleichzeitig die AMPKK ebenfalls die CAMK aktiviert. Zudem wird die AMPK indirekt durch die *Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1 und 2* (ERK 1/2) aktiviert. Sie hemmt zudem mechanistic Target of Rapamycin (mTOR), das seinerseits die Proteinkinase Ba (Akt/PKB) aktiviert, die die AMPK hemmt. Zudem stimuliert die AMPK die Aktivität von *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α)

Aktivität stimuliert (305–307) (siehe Abb. 1.3.7) und interagiert so mit weiteren wesentlichen Signalwegen der Muskelregulation.

Die AMPK ist wesentlich an der Regulation der Muskelregulation beteiligt (308). Sie vermittelt die Atrophie bei Denervierung, ist bei Inaktivität vermindert, jedoch gleichzeitig für eine effiziente Muskelregeneration notwendig (309–311). Dabei scheint der Effekt je nach Muskelfasertyp unterschiedlich zu sein. In oxidativen, langsamen Typ I-Fasern führt Inaktivität zu einer deutlichen Reduktion der AMPK-Aktivität, während die Reduktion in schnellen Fasertypen geringer ausfällt (310).

Für einige Signalwege im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz ist ein direkter Einfluss auf die AMPK bekannt. So erhöhen IL-6 und TGF β die AMPK-Aktivität (137, 153). Apelin erhöht die AMPK-Aktivierung durch Phosphorylierung, was für dessen kraftsteigernde Wirkung am Skelettmuskel essentiell ist (107, 113, 303). Zum Effekt von Myostatin auf die AMPK gibt es kontroverse Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass Myostatin im Skelettmuskel die Proteinsynthese AMPK-vermittelt hemmt, während am Herzen die AMPK-Aktivität durch Myostatin gehemmt wurde (153, 312). Ob dieser Effekt auf unterschiedliche Einflüsse auf die AMPK-Isoformen oder aber eine gewebespezifisch differente Regulation handelt, ist unklar.

Sie agiert als Energiesensor der Zelle. Als Antwort auf einen Energiemangel reduziert sie vornehmlich die Aktivität energiebedürftiger Prozesse wie der Proteinsynthese durch eine Hemmung der mTOR-Aktivität und der Elongation (287–291). Gleichzeitig erhöht sie die zelluläre Glucoseaufnahme, regt die Fettsäureoxidation an und stimuliert die Autophagie und die Proteindegradation über das Ubiquitin-Proteasom-System (113, 137, 292–303). Sie interagiert intrazellulär mit vielen weiteren Signalkaskaden. So kommt es zu einer gegenseitigen Kreuzaktivierung der AMPK-Kaskade und der CamK-Kaskade (202, 203). Zusätzlich stimuliert die AMPK PGC1 α (304). Sie wird von Akt gehemmt, von Erk1/2 jedoch indirekt in ihrer Aktivität stimuliert (305–307) und interagiert so mit weiteren wesentlichen Signalwegen der Muskelregulation.

1.4 Kontraktile Apparat in Skelettmuskelzellen

1.4.1 Sarkomerstruktur

Die durch die Skelettmuskelzellen ermöglichte mechanische Aktivität eines Muskels wird durch einen intrazellulären, kontraktionsfähigen makromolekularen Komplex gewährleistet, der als Sarkomer bezeichnet wird (313).

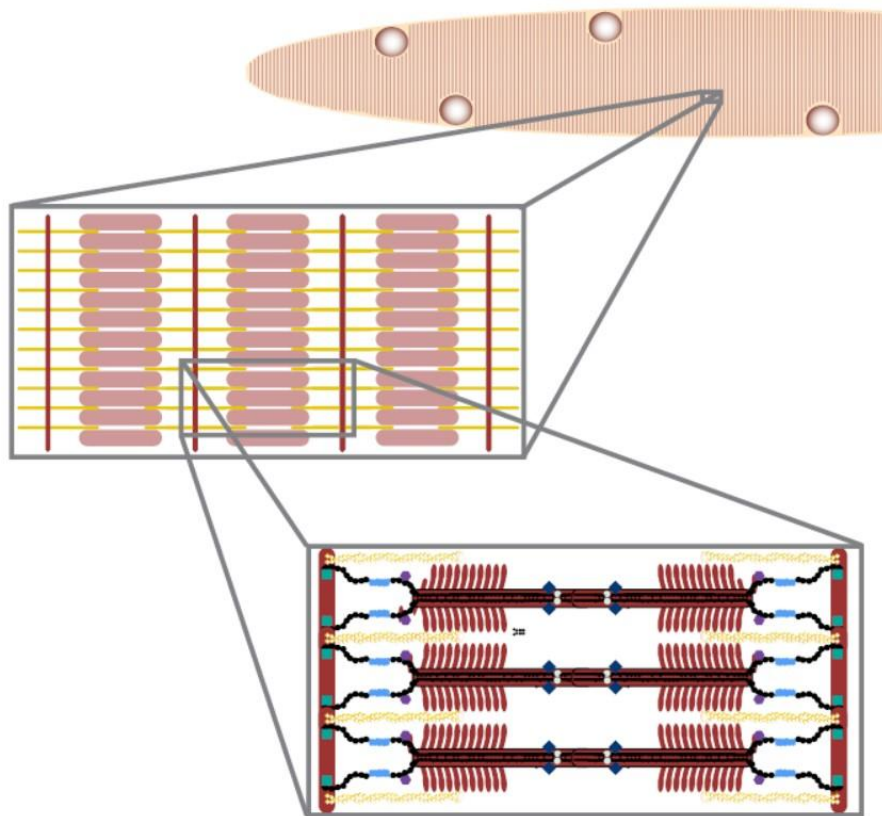


Abb 1.4.1
Schematischer Aufbau
des kontraktile
Apparates einer
Skelettmuskelzelle.

Dargestellt ist oben die mikroskopische Querstreifung aus dunklen, anisotropen Banden, in denen Myosinpolymere liegen und hellen, isotropen Banden, in denen die Z-Scheibe und Aktin liegen. In der ersten Vergrößerung sind die Myosinpolymere als horizontale, hellbraune Balken dargestellt. Sie liegen zwischen Aktinfilamenten (gelbe, horizontale Balken), die über die Z-Scheibe (vertikaler, dunkelbrauner Balken) stabilisiert und mit

den Zytoskelett verbunden werden. In der zweiten Vergrößerung sind die einzelnen Myosin-Köpfchen im Polymer (Dunkelbraune querliegende Struktur) dargestellt, die an dem repetitiven Aktinpolymer (gelbe, horizontale Doppelhelix) binden, welche wiederum auf der Z-Scheibe (vertikaler, dunkelbrauner Balken) ansetzen. Hier ist zudem Titin (schwarzes Filament mit hellblauer PEVK-Region) dargestellt und unterschiedliche Interaktionspartner des Sarkomes sind angedeutet.

Lichtmikroskopisch zeigten Skelettmuskelzellen einen hochstrukturierten, repetitiven Aufbau aus isotropen und anisotropen Banden im Sarkoplasma, wobei die Bandenkontraktion mit einer Annäherung und Verschmälerung der isotropen Banden zu einer Zellkontraktion führt (314). Diese Beobachtung ist durch das ineinanderschieben verschiedener, filamentöser Makromoleküle zu erklären, was unter dem Namen *Sliding filament theory* zusammengefasst wird (314).

Die anisotrope Bande besteht dabei aus sterisch modifizierbaren Myosin-Filamenten, die isotrope Bande aus strukturgebenden Aktin-Filamenten, die an der Z-Scheibe in der Mitte der isotropen Bande aufgehängt sind (315). Die Z-Bande verbindet Aktinmoleküle und integriert das Sarkomer in das Zytoskelett (316). Zusätzlich spannen Titinmoleküle zwischen Z-Bande und Myosinfilamenten und vermitteln durch ihre Eigenelastizität die passive Muskelkraft bei Dehnung (317).

Myosinproteine kommen in aus Myosinmultimeren gebildeten Filamenten vor. Jedes einzelne Protein beinhaltet eine Kopfregion, die mit Aktin interagieren kann (318), und eine Schwanzregion, die für die Polymerisation von mehreren Myosinmolekülen essentiell ist (319). Zusätzlich werden diese Multimere in der M-Bande entgegen der Kontraktionsrichtung mit weiteren Myosinmultimeren verbinden und sterisch in der anisotropen Bande stabilisiert (320).

1.4.2 Chemomechanische Krafttransduktion

Über die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) im Sarkomer ist der Skelettmuskel eine aktive Kontraktion möglich. Hierbei spielt eine Konformationsänderung der einzelnen Myosinmoleküle innerhalb des Multimers bei gleichzeitiger Interaktion mit Aktin die entscheidende Rolle (321).

Der Myosinkopf besitzt eine ATPase-Domäne und durchläuft im Rahmen der ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung in Interaktion mit Aktin, die zu einem Wechsel der Interaktionsstelle auf dem Aktinpolymer und mikroskopisch zu einem Ineinanderrutschen der Filamente führt (322). Dieser Vorgang läuft gleichzeitig an unterschiedlichen Myosinmolekülen ab und wiederholt sich an der nächsten Interaktionsstelle mit Aktin, was als Querbrückenzyklus bezeichnet wird. Bei niedriger intrazellulärer Calciumkonzentration blockiert das Molekül Tropomyosin durch Aktinbindung sterisch die Aktin-Myosin-Interaktion, hemmt so die ATP-Hydrolyse durch Myosin und ermöglicht eine Regulation der Kontraktionsaktivität (323).

Innerhalb des Myosin-Multimers liegen Myosinmoleküle je nach Isotyp als Dimere oder Monomere vor. Bei Myosindimeren im Myosinmultimerkomplex ergibt sich durch einen Versatz des Querbrückenzyklus zwischen beiden Myosin-Köpfen ein Wechselspiel aus fester Bindung eines Kopfes, Repositionierung der Bindungsstelle des freien Kopfes, dann wiederum fester Bindung des Letzteren und Mobilisation des Ersteren, was als *hand over hand*-Modell bekannt ist (324). Einzelne Myosintypen zeigen eine hohe Bindungsaffinität für Aktin mit geringer ATP-Hydrolyserate, sodass eine Stabilisierung der Aktin-Myosin-Interaktion resultiert, die es anderen Myosinmolekülen ermöglicht weiter in Kontraktionsrichtung gelegene Bindungsstellen am Aktinpolymer zu binden (325).

Für die chemomechanische Transduktion ist also die strukturell-festgelegte Interaktion von Aktin- und Myosin wie sie durch die Strukturmerkmale des Sarkomers vorgegeben wird entscheidend und kann einen Einfluss auf deren Regulation

nehmen. Die Rolle des Titinmoleküls in diesem Rahmen soll als Gegenstand dieser Arbeit im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden.

1.5 Titin

1.5.1 Übersicht

Das Titinprotein ist ein Sarkomerprotein von entscheidender Bedeutung für die Mechanik von Muskelzellen und für die Umsetzung mechanischer Reize in eine biochemische Zellantwort (siehe Abb. 1.5.1). Es ist Zielstruktur von Modifikationen induziert durch unterschiedliche Signalwege und interagiert mit einer Reihe von Proteinen, die in Antwort auf einen mechanischen Reiz den Zellstoffwechsel beeinflussen.

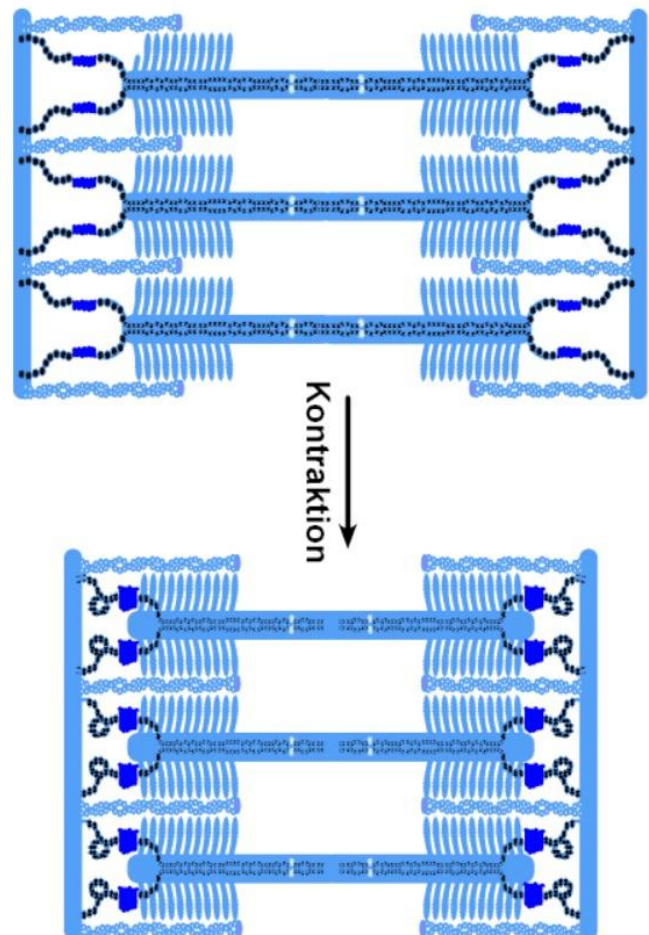
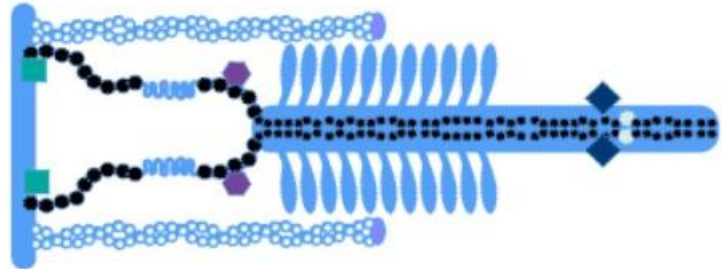


Abb. 1.4.2 Schematischer Ablauf der Filamentverschiebung im Rahmen der Kontraktion. Dargestellt sind Aktin (blaue Doppelhelix), Z-Scheiben (vertikaler blauer Balken), Myosin (horizontaler Balken mit keulenförmigen Fortsätzen) und Titin (schwarzes Filament). Bei der Kontraktion wandern die Myosinköpfe dem Querbrückenzyklus folgend am Aktin entlang, was zu einer Annäherung der beiden Z-Scheiben führt. Diese Kontraktion wird über die Z-Scheibe an das Zytoskelett und somit die gesamte Muskelzelle weitergegeben. Gleichzeitig kommt es zu einer Verkürzung und mechanischen Vorspannung von Titin.

Im Folgenden werden relevante Erkenntnisse über die mechanischen Einflüsse von Titin dargestellt, anschließend mögliche Modifikationen am Titin-Protein erläutert, die die Mechanik beeinflussen können, und zuletzt ein Fokus auf mit Titin interagierende Signalwege mit Relevanz im Rahmen der Herz- und Skelettmuskelerkrankungen gelegt.

1.5.2 Titinphysiologie und Mechanik

Titin ist ein gigantisches Sarkomerprotein, das in einer klar strukturierten epitopenspezifischen Anordnung das halbe Sarkomer überspannt (326, 327). Es bindet in seiner Zwischen-Streifen (Z-



Streifen)-nahen Region an Aktin und in der anisotropen Bande (A-Bande) an Myosin (5, 328, 329). Dabei bildet es in der isotropen Bande (I-Bande) symmetrische Hexamere (330). Am Z-Streifen interagiert es zusätzlich mit Nebulin, was eine Rolle bei der Koordination der Sarkomerstruktur spielt (331–333).

Abb. 1.5.1 Schematischer Aufbau von Titin und Lokalisation am Sarkomer. Es bindet im Z-Streifen (vertikaler blauer Balken) an Aktin und in der anisotropen Bande an Myosin (horizontaler Balken mit keulenförmigen Fortsätzen). Es besitzt eine modifizierbare, elastische Domäne die Prolin-, Glutamin-, Valin- und Lysinreiche PEVK-Region (blaue Feder) und eine weitere mechanische Region die *Immunglobulin-like Domains* auf (schwarze Kreise). An der Z-Scheibe bindet es zusätzlich an *Muscle LIM* (lin-11, islet-1, mec-3)-Proteine (MLP, grünes Rechteck), in seiner interfilamentären Region bindet es an *Muscle Ankyrin-Repeat Proteine* (violettes Sechseck), und in der I Bande bindet es an *muscle RING-finger protein-1 (MuRF1)* (dunkelblaue Raute) und weist hier eine Kinasedomäne (hellblauer Kreis) auf

Unter den Titinisoformen unterscheidet man je nach Vorhandensein von weiteren Domänen N2A-Titin, N2B-Titin

oder bei gleichzeitigem Vorhandensein beider Domänen N2BA-Titin. Da die N2B-Sequenz nur im Herzen exprimiert wird, findet sich im Skelettmuskel ausschließlich N2A-Titin (178, 334). Dieses kann sich jedoch in der Länge und Steifigkeit seiner elastischen Domänen unterscheiden, wird also in skelettmuskelspezifischen Isoformen exprimiert.

Innerhalb des Proteins befinden sich zwei elastische Domänen. Es gibt eine repetitive *Immunglobulin-like* (Ig)-Domäne und die Prolin-, Glutamin-, Valin- und Lysinreiche Region (PEVK-Region), die beide bestimmte mechanische Funktionen erfüllen (335). In der Ig-Domäne finden sich Immunglobulin-ähnliche und Fibronectin-Strukturen in einem repetitiven Muster, die durch *Linker*-Regionen miteinander verknüpft werden. Zwischen einander sind die Domänen dehnbar, wobei das Ausmaß dieser Dehnbarkeit von der Länge der Linker-Region abhängt (336, 337).

Die größte Bedeutung kommt dem Protein im Zusammenhang mit der passiven Muskelmechanik zu. Es vermittelt gemeinsam mit Kollagen die passive Muskelfasersteifigkeit und ist entscheidend für die passive Steifigkeit des Sarkomers (5–8). Das Verhältnis, in dem Kollagen und Titin über die Muskelsteifigkeit bestimmen, ist je nach Muskel unterschiedlich wie auch die Titinisoformenexpression (7). Hierbei gibt es meistens nur eine Isoform pro Muskel, in manchen Muskeln wie dem *Musculus psoas* (M. psoas) kommen jedoch auch mehrere vor (7). Die Titinisoformen in langsamen, oxidativen Muskelfasern sind größer als in schnellen Muskelfasern (7, 338). Es wurde beobachtet, dass grundsätzlich in langsamen, oxidativen Muskelfasern die passive Steifigkeit bei Dehnung höher ist, als in schnellen Muskelfasern, wohingegen der Anteil, den Titin an dieser Fasersteifigkeit hat, verglichen mit schnellen Fasern geringer ist (7, 338).

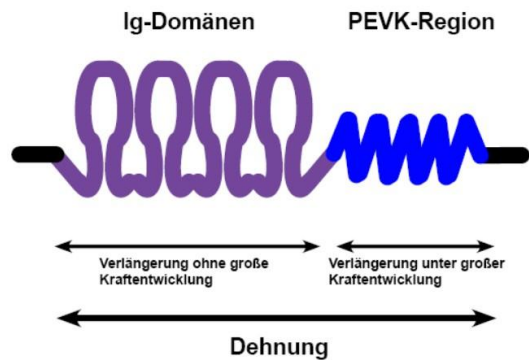


Abb. 1.5.2 Aufbau der mechanisch relevanten Titindomänen im Rahmen der sequentiellen Extensionstheorie. Die *Immunoglobuline-like*-Domänen (Ig-Domänen) verlängern sich bis zu einem gewissen Grad ohne große passive Kraftentwicklung. Erst anschließend erfolgt die Dehnung der elastischen Prolin-, Glutamin-, Valin- und Lysinreiche PEVK-Region, bei deren Dehnung große passive Kraft entsteht

Für das Verhalten von Titin während einer Dehnung ist die sequenzielle Extensionstheorie etabliert. Nach dieser verlängert sich bei schwacher Dehnung zunächst die *Immunoglobuline-like*-Domäne (Ig-Domäne), ohne dabei in relevantem Maße passive Kraft zu generieren (335, 338–346). Bei weiterer mittelstarker bis starker Dehnung kommt es dann zusätzlich zu einer Dehnung der PEVK-Region, die dabei große passive Kraft erzeugt (335, 338–346). Demzufolge entscheidet die Länge der Ig-Domäne im Titin vornehmlich über die Sarkomerlänge und die Länge und Steifigkeit der PEVK-Region über die passive Steifigkeit des Sarkomers (335, 338–346) (siehe Abb. 1.5.2). Wird die Muskelfaser dann noch weiter gedehnt werden zunehmend extrasarkomere Strukturen für die passive Steifigkeit relevant (347).

Bei einer aktiven Muskelkontraktion, wird der von Titin überbrückte Raum zwischen Myosin und dem Z-Streifen kleiner, wobei sich Titin elastisch mitbewegt (348). Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Calciumbindung an Titin im Rahmen der

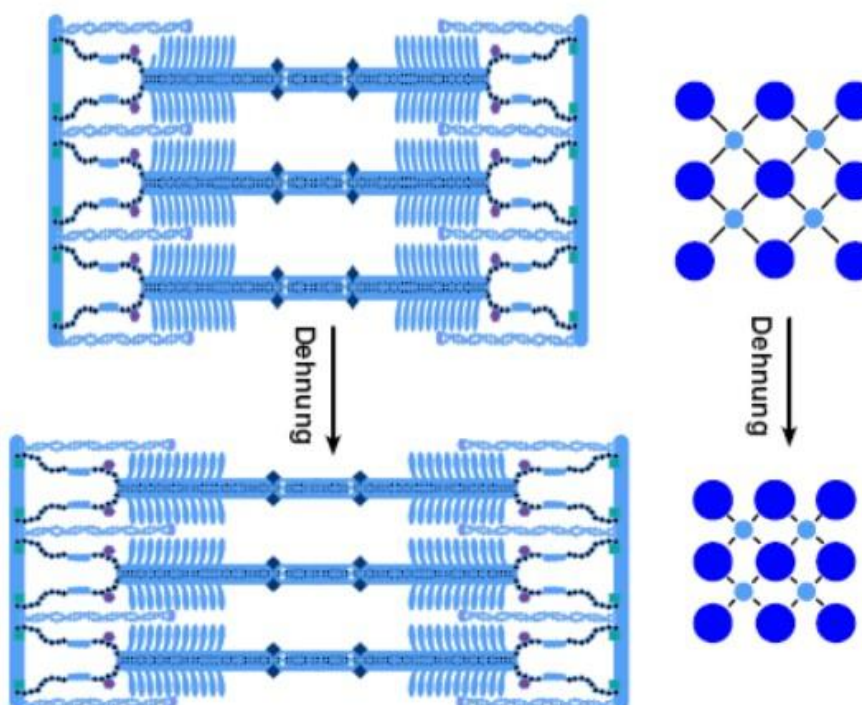
Kontraktion das Protein an der PEVK-Region verkürzt und versteift (349). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Titin das Sarkomer bei einer Kontraktion stabilisiert (350).

Besonders prominent ist die Rolle von Titin für die dehnungsinduzierte Kraftsteigerung am Herzen, bekannt als Frank-Starling-Mechanismus. Dort erhöht eine Dehnung der die passive Kraft durch Titin, sondern auch die aktive Kraft bei gleichzeitig erhöhter Calciumsensitivität (18, 19). Dieser Effekt scheint nicht durch die Anzahl an Querbrückenbindungen erklärbar zu sein (351). Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Dehnung die Dichte aus Myosin- und Aktinfilamenten erhöht, sodass sich der Abstand um die Querbrücken reduziert (20). Dieser Effekt ist bei längeren Titin-Isoformen vermindert ausgeprägt, während Steifere ihn verstärken (20, 21). Betrachtet man die Anordnung der Sarkomerproteine, leuchtet ein,

Kraftsteigerung am Herzen, Herzmuskelfasern nicht nur

Abb. 1.5.3 Schema zur mechanischen Grundlage des Frank-Starling-Mechanismus. Links:

Schematisiertes Sarkomer mit Aktin (hellblaue Doppelhelix), verankert in der Z-Linie (vertikaler Balken) und Myosin-Polymer (horizontaler Balken mit keulenförmigen Fortsätzen). Quer dazwischen verspannt liegen Titin-Proteine (schwarz-blaue Kette). Bei Dehnung wird durch begrenzte Verlängerbarkeit von Titin das Sarkomer insgesamt gestaucht, sodass sich Aktin- und Myosinfilamente annähern. Rechts: Schematischer Querschnitt durch das Sarkomer. Myosin (dunkelbaue Kreise) und Aktin (hellblaue Kreise) sind durch Titin (schwarze Linien) verbunden. Kommt es zu einer Sarkomerdehnung verringert sich der interfilamentäre Abstand durch die Titinfixierung in beiden Filamenten



dass Titin bei vermehrter Dehnung aufgrund seiner queren Verspannung zwischen Aktin und Myosin-Filamenten diese zueinander zieht (siehe Abb 1.5.3). Bei Herzinsuffizienz ist der Mechanismus am Herzen eingeschränkt (351). Ob dieser Effekt auch im Skelettmuskel eine Rolle spielt ist weniger gut untersucht, jedoch korrelieren auch hier längere Titinisoformen mit einer reduzierten aktiven Kraft, Calciumsensitivität und Dehnungsaktivierung (352). Aufgrund des analogen Aufbaus des Sarkomers im Herz- und im Skelettmuskel, könnte der Effekt also übertragbar sein.

1.5.3 Titinmodifikationen

Eine schnelle Regulation von Titin erfolgt durch die Phosphorylierung spezifischer Sequenzen. Für eine Vielzahl von Kinasen aus unterschiedlichen Signalwegen ist dabei gezeigt worden, dass sie Titin phosphorylieren. Außerdem ist bekannt, dass Titin insgesamt eine hohe Grundphosphorylierung aufweisen kann (17). Es sind Phosphorylierungen durch ERK1/2, die *cdc-like*-Proteinkinasen, Proteinkinase G (PKG), Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und CamKII bekannt. (17, 175–177, 353–357).

Die Proteinkinase G verringert abhängig von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) die Steifigkeit kardialen Titins durch Phosphorylierung in der N2B-Region, was dessen Ruhelänge erhöht und bei Herzinsuffizienz vermindert abläuft (355). Auch wenn neben einer Phosphorylierung des herzspezifischen N2B-Titins auch eine Phosphorylierung des skelettmuskeltypischen N2A-Titins durch die PKG *in vitro* nachgewiesen wurde, fand sich bei letzterem keine Veränderung der passiven Steifigkeit (355). Auch wenn also der cGMP-PKG-Signalweg bei Herzinsuffizienz beeinträchtigt ist, ist ein direkter Einfluss auf skelettmuskuläres Titin auf Grundlage dieser Daten nicht zu erwarten.

Auch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert herzspezifisch Titin und reduziert so dessen Steifigkeit (175–177, 355). Es phosphoryliert sowohl N2B- als auch N2BA-Titin, wobei der Einfluss auf die Mechanik von N2B-Titin stärker ausgeprägt zu sein scheint, als der auf N2BA-Titin (176). Zu der Frage, ob die PKA auch das skelettmuskuläre N2A-Titin phosphorylieren kann, gibt es kontroverse Ergebnisse (175, 358). Jedoch gelang selbst in der Arbeitsgruppe, die eine Phosphorylierung beobachtet hat, kein Nachweis eines Einflusses auf die mechanischen Eigenschaften von N2A-Titin (358). Daher spielt die PKA wohl bei der mechanischen Regulation von Titin im Skelettmuskel auf direktem Weg keine Rolle, könnte aber einen Einfluss auf andere Signalwege haben, die Sekundäreffekte verursachen.

Eine weitere Kinase, die Titin am Herzen phosphoryliert und die passive Steifigkeit erhöht, ist die Calmodulin-abhängige Kinase II δ (CamKII δ). Dies erfolgt sowohl in der PEVK-Region an Serin 12022 und Serin 12884, als auch in der N2B-Region (356, 357). Im Herzinsuffizienzmodell ist die Expression der CamKII δ erhöht (359). In Antwort darauf kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung der N2B-Region, während die Phosphorylierung der PEVK-Region unverändert bleibt (357). Wie oben beschrieben könnte es bei einer Herzinsuffizienz zu einer vermehrten Aktivität der CamKII-Kaskade womöglich auch im Skelettmuskel kommen. Da allerdings die PEVK-Phosphorylierung im Herzen unbeeinträchtigt war, und lediglich diese Region auch im Skelettmuskel exprimiert wird, ist hieraus kein zu erwartender Einfluss auf die Titinmechanik im Skelettmuskel abzuleiten.

Im Skelettmuskel erhöht die PKC α die Steifigkeit von Titin. Sie phosphoryliert Titin in der PEVK-Region an Serin 11878 und Serin 12022, was die passive Steifigkeit erhöht (16, 17). Wie oben beschrieben konnte zumindest am Herzen gezeigt werden, dass die PKC α bei Herzinsuffizienz vermehrt aktiv ist und es zu einer vermehrten Phosphorylierung von Serin 11878 kommt, während die Phosphorylierung von Serin 12022 scheinbar vermindert ist (12–15). Ob die PKC α auch am Skelettmuskel im Rahmen der Herzinsuffizienz einen Einfluss auf Titin nimmt, ist unklar. Da aber wie oben beschrieben PKC α -aktivierende Signalwege bei Herzinsuffizienz vermehrt aktiv sind, liegt diese Erwartung nahe.

1.5.4 Titinabbau

Die Mechanismen und der genaue Vorgang, nachdem der Abbau des Titin-Proteins erfolgt, ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Hier soll nur ein Überblick über beteiligte und im Rahmen dieser Arbeit relevante Mechanismen gegeben werden.

Trotz seiner enormen Größe spielt auch beim Titin das Ubiquitin-Proteasom-System eine entscheidende Rolle in dessen Abbau. So wird Titin direkt von MuRF-Proteinen ubiquitiniert (226). Interessanterweise bindet MuRF1 an Titin in der Nähe der Titinkinasedomäne (228). Auch Muskel *RING-finger* Protein 2 (MuRF2) interagiert vermittelt über das Zink-Finger-Protein nbr1 und Ubiquitin-assoziiertes p62 (SQSTM1) mit Titin (31). Dies könnte womöglich an der inaktivitätsgesteuerten Aktivierung der Proteindegradation im Muskel beteiligt sein (31).

Auch für die Matrix-Metalloproteasen konnte eine Funktion im Titinabbau beobachtet werden. Es ist zudem bekannt, dass der durch sie vermittelte Abbau nach einer Herzmuskelschämie und bei Herzinsuffizienz am Herzen verstärkt abläuft (360, 361). Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass sowohl die AT-ACE-Aldosteronachse als auch inflammatorische *Pathways* über eine Aktivierung von Erk1/2 die Transkription von Matrix-Metalloproteasen induzieren (143, 164, 165) (siehe Abb 1.5.4). Da erhöhte Serumspiegel eines metalloproteasen-spezifischen Abbauprodukts von Titin mit Muskelatrophie korrelieren (362), ist anzunehmen, dass der Abbau auch im Skelettmuskel eine Rolle spielt. Da sowohl die AT-ACE-Aldosteronachse, als auch inflammatorische *Pathways* bei Herzinsuffizienz systemisch erhöht sind, könnten sie eine Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen auch im Skelettmuskel induzieren (143, 164, 165).

Auch für Calpaine ist eine Relevanz im Zusammenhang mit dem Titinabbau bekannt. Während Calpain 1 calciumabhängig hochaffin an die Ig-Domäne von Titin bindet, bindet Calpain 3 calcium- und calmodulinabhängig Titin an der N2A-Region und vermittelt dessen Abbau (205, 363, 364). Über diesen Weg können also die calciumabhängigen Signalwege den Abbau von Titin induzieren.

An der Stabilisierung von Titin gegen Schaden und dessen Abbau sind Chaperone beteiligt. Das Heat-Shock-Protein 90 (Hsp90) bindet Titin, nachdem es von Smyd2-methyliert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dies Titin stabilisiert (265). Auch Hsp27 bindet stressabhängig an Titin (264). Eine Besondere Rolle am Herzen nimmt α B-Cristallin ein. Es bindet stressinduziert an N2B-Titin im

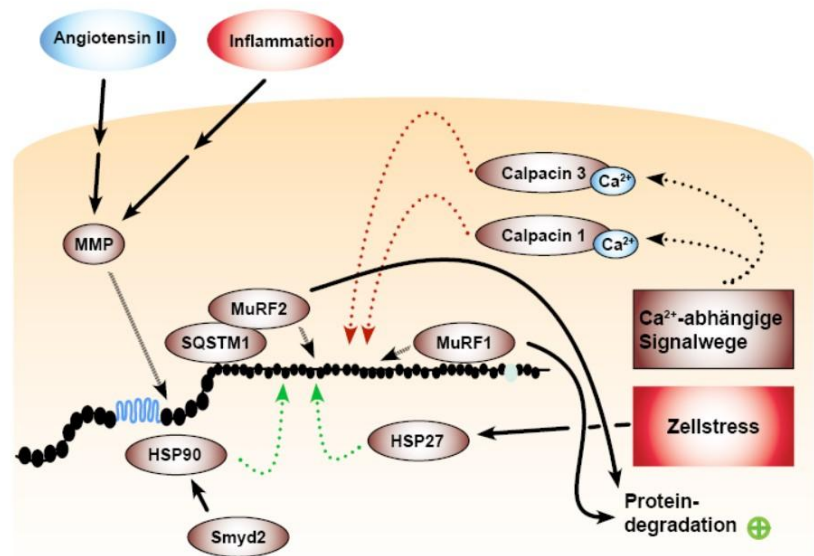


Abb. 1.5.4 Prozesse beim Abbau von Titin. Im Rahmen einer Inflammation sowie durch die Aktivität von Angiotensin II kommt es zu einer gesteigerten Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Diese sind am Abbau des Titinproteins (schwarz-blau dargestellt) beteiligt. Über das Zink-Finger-Protein nbr1 und Ubiquitin-assoziiertes p62 (SQSTM1) ist *muscle RING-finger protein-2* (MuRF2) an Titin gebunden und an dessen Abbau beteiligt. Auch das *muscle RING-finger protein-1* (MuRF1) bindet Titin und spielt eine Rolle in dessen Abbau. Über Calcium (Ca²⁺)-abhängige Signalwege kommt es zu einer Ca²⁺- und Calmodulin-abhängigen Aktivierung von Calpacin 1 und 3. Diese beteiligen sich ebenfalls am Abbau von Titin. *SET and MYND Domain Containing 2 Protein* (Smyd2) methyliert das *Heat Shock Protein 90* (HSP 90). Dieses bindet und stabilisiert so Titin. Das *Heat Shock Protein 27* (HSP27) bindet bei Zellstress vermehrt an Titin und trägt ebenfalls zu dessen Stabilisierung bei. Zusätzlich fördern MuRF1 und MuRF2 im Allgemeinen die zelluläre Proteindegradation

Herzen, erhöht so dessen passive Kraft bei Dehnung und hemmt womöglich dessen Abbau nach Ischämie. Es verhindert aber auch die Assoziation von unterschiedlichen Titinfilamenten bei Dehnung, was das Sarkomer versteifen würde (263, 365, 366). Es wird diskutiert, ob diese besondere Rolle von α B-Cristallin am Herzen im Skelettmuskel von *Cardiac ankyrin repeat protein* (CARP) eingenommen wird (358).

1.5.5 Muscle Ankyrin Repeat Proteine (MARP)

Neben ihrer diskutierten Funktion als Chaperone interagiert die Familie der *Muscle ankyrin repeat proteins* (MARP), zu der das *cardiac ARP* (CARP), das *diabetes-related ARP* (DARP) und das *Ankyrin repeats containing domain 2* (Ankrd2) gehören, mit unterschiedlichen Signalwegen und dem Titinprotein.

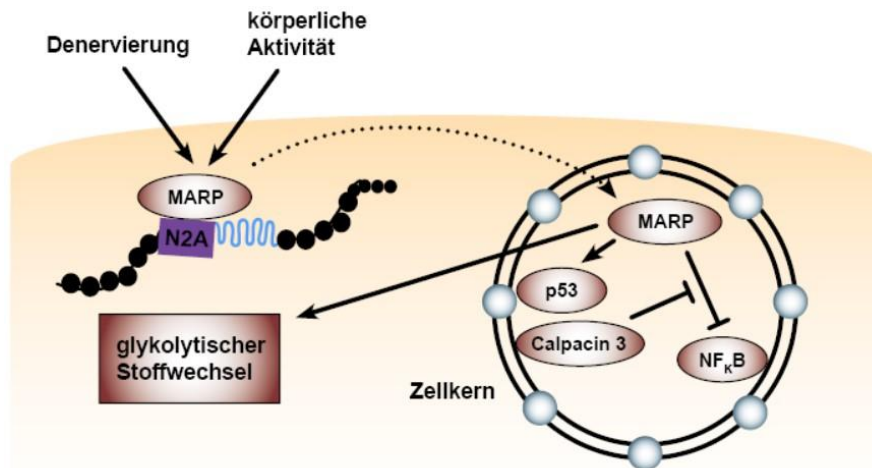


Abb. 1.5.5 Lokalisation und Funktion der *Muscle Ankyrin Repeat Proteine* (MARP). MARP binden spezifisch in der N2A-Region von Titin und beeinflussen dessen Mechanik. Gleichzeitig kommt es abhängig von der körperlichen muskulären Aktivität und Einflüssen wie Denervierungen zu einer Translokation von MARP in den Zellkern. Dort aktivieren sie das p53-Protein (p53) und hemmen die Aktivität von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B), wobei sie von Calpacin 3 gehemmt werden. Zudem stimulieren MARP ein Expressionsmuster, das den glykolytische Stoffwechsel steigert

langsameren Fasern (245).

Der Titin-MARP-Komplex beeinflusst die skelettmuskuläre Transkription dehnungs-abhängig. Durch Dehnung kommt es zu einer vermehrten Expression von MARP und einer Translokation in den Kern (25). Ob dieser Effekt durch Titin vermittelt wird, ist unklar, jedoch erscheint es durch die Bindung der Proteine an Titin und die Tatsache, dass Titin im Rahmen der Dehnung seine Struktur ändert, einleuchtend, dass eine direkte Interaktion die Translokation veranlasst. Es sind unterschiedliche Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren belegt, die zu einer veränderten Expression führen (22–24). CARP stimuliert p53, einen wichtigen Regulator der Apoptose, der seinerseits wiederum die Expression von CARP stimuliert (23) (siehe Abb 1.5.5). Außerdem hemmt CARP NF κ B, wobei gezeigt werden konnte, dass Calpain 3 diesen Einfluss hemmt (24). In der gleichen Studie konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung von NF κ B auch die MuRF-Expression beeinträchtigt (24). Dennoch ist die intrazelluläre CARP-Expression bei unterschiedlichen Formen der Muskelatrophie wie durch Denervierung oder genetische Defekte im Skelettmuskel erhöht und macht eine entscheidende Rolle dieses Regulationsproteins wahrscheinlich (24).

MARP spielen außerdem eine Rolle im Muskelzellstoffwechsel und beeinflussen den Fasertypen. Sie werden von exzentrischen Kontraktionen induziert und begünstigen die Bildung von schnellglykolytischen Fasern (244–246). Dennoch konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass zumindest Ankrd2 in langsamen, oxidativen Typ I-Fasern vermehrt exprimiert wird (370). In Anbetracht dessen ist der genaue Zusammenhang von MARP und den Fasertypen unklar und eine unterschiedliche Rolle für unterschiedliche MARP denkbar.

Die Interaktion mit Titin erfolgt spezifisch in der N2A-Region und beeinflusst deren Mechanik. Sowohl für CARP als auch für DARP ist eine spezifische Interaktion mit Titin nachgewiesen (367–369). Es ist ferner bekannt, dass CARP durch Bindung an Titin dessen Steifigkeit erhöht und dessen Modifikation durch Phosphorylierung beeinflusst (358, 369). Analog zu dieser Beobachtung führt ein Fehlen der MARP zu Fasern mit geringerer Steifigkeit, erhöhter Ruhesarkomerlänge und

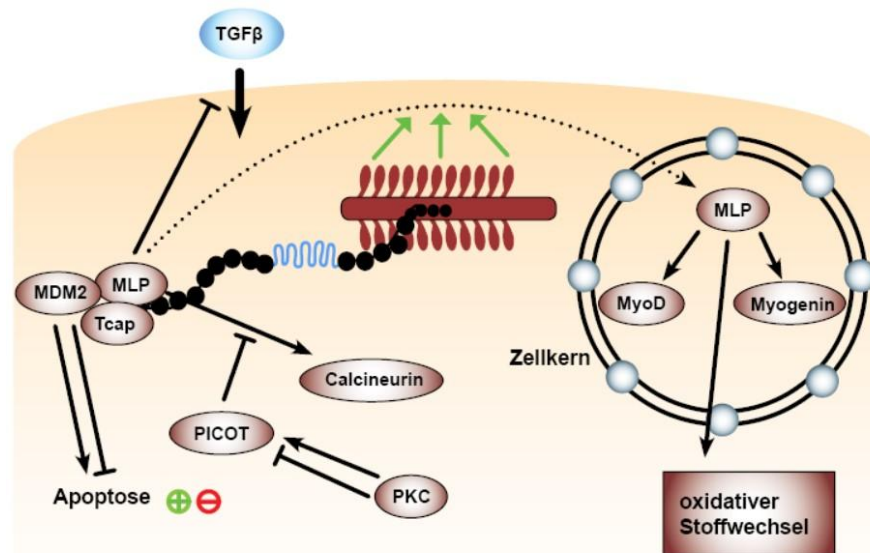
Zudem konnte unter unterschiedlichen Einflüssen eine veränderte Expression von MARP nachgewiesen werden. So kommt es einerseits im Skelettmuskel bei körperlicher Aktivität zu einer vermehrten Expression von CARP und ankrd2, während andererseits auch eine Denervierung zu einer vermehrten Expression von CARP und Ankrd2 führt (26, 370, 371). Die expressionsstimulierenden Einflüsse körperlichen Trainings auf MARP scheint also nicht von der Innervation sondern von anderen Mechanismen abhängig zu sein.

Am Herzen ist bei der dilatativen Kardiomyopathie die Expression von CARP, DARP und ankrd2 erhöht (372). Außerdem konnte gezeigt werden, dass DARP im Herzen bei Diabetes sowie vermehrter Glucosezufuhr hochreguliert und bei Nahrungsmangel herunterreguliert ist (373). Ob derartige Veränderungen bei Herzinsuffizienz oder Diabetes auch im Skelettmuskel ablaufen, ist unklar.

1.5.6 LIM-Proteine

Lin-11, Islet-1, and Mec-3-Proteine (LIM-Proteine) sind eine Familie von zellulären Signalproteinen, die Funktionen im Rahmen der zellulären Stressantwort, der Zelldifferenzierung und dem Erhalt eines intakten Zytoskeletts übernehmen und teilweise mit Titin interagieren.

LIM-Proteine spielen eine besondere Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen anderer Proteine (374). Es konnte für unterschiedliche LIM-Proteine nachgewiesen werden, dass sie für die Intaktheit der Zytoarchitektur am Herzen und am Skelettmuskel essenziell sind (29, 375, 376).



Sie liegen in der Zelle assoziiert an das Zytoskelett in Oligomeren vor und können als Antwort auf bestimmte Stimuli in den Zellkern migrieren und dort die Transkription beeinflussen (27). Sie werden durch körperliche Aktivität in ihrer Expression stimuliert und bewegen sich dann vermehrt in den Zellkern (26, 28). Dort interagieren sie mit den

Abb. 1.5.6 Lokalisation und Wirkung von Muscle *Lin-11, Islet-1, and Mec-3*-Proteinen (MLP) im Skelettmuskel. MLP wird über Teletheonin (Tcap) an Titin (schematisch schwarz-blau dargestellt) rekrutiert. Tcap interagiert zudem mit dem murine double minute 2-Protein (MDM2), das von Relevanz in der Regulation der Apoptose ist. MLP stimuliert zudem Calcineurin, wobei es von *protein kinase C-interacting cousin of thioredoxin* (PICOT) gehemmt wird, der seinerseits mit der PKC-Familie (PKC) interagiert. MLP hemmt die zelluläre Wirkung von *Tumor-Growth-Factor β* (TGFβ). Zudem kann MLP in den Zellkern transferieren, was durch eine vermehrte Myosin-Kinase-Aktivität (schematisch braun dargestellt) stimuliert wird. Dort steigert es die Aktivität der Transkriptionsfaktoren Myogener Faktor 3 (MyoD) und Myogenin und fördert einen oxidativen Stoffwechsel

Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin und erhöhen deren DNA-Bindungsaktivität, wobei dem Muskel-LIM-Protein (MLP) eine besondere Bedeutung zukommt (377). Dieser Weg wird auch durch Muskelzellschäden induziert und es konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte MyoD-

Aktivität umso stärker ausfiel, wenn die anderen LIM-Proteine neben MLP ausgeschaltet sind (245). Eine Hemmung der Myosin-ATPase-Aktivität, konnte jedoch die Translokation von MLP in den Zellkern hemmen (28, 378).

MLP interagiert mit Titin und induziert neben den von ihm beeinflussten Transkriptionsfaktoren auch die Calcineurin-NFAT-Achse (29, 30). Die Interaktion mit Titin wird dabei zusätzlich durch

Telethonin (Tcap) konformationsabhängig stabilisiert, welches selbst auch eigenständig mit Titin interagiert (30, 379, 380). Tcap selbst stellt zudem eine weitere wichtige Brücke dar, da es mit *murine double minute 2*-Protein (MDM2) und damit dem Apoptosesignalweg interagiert (381). Die Interaktion von MLP mit Calcineurin wird durch *protein kinase C-interacting cousin of thioredoxin* (PICOT) gehemmt, der seinerseits mit der PKC-Familie, insbesondere PKC ζ , interagiert (382–384). Neben dem Einfluss auf die Calcineurin-NFAT-Achse, den MLP ausübt, reduziert es zudem die TGF β -Sensitivität der Muskulatur (29, 385) (siehe Abb 1.5.6). Für ein anderes LIM-Protein, das herzspezifische *four and a half* LIM-Protein, ist ein titinabhängig regulierter Einfluss auf den Raf-MEK-Erk1/2-Weg bekannt (386, 387). Ob dieser Effekt am Skelettmuskel von einem anderen LIM-Protein übernommen wird, ist unklar.

Eine weitere wichtige Rolle kommt den MLP in der Fasertypenregulation und Muskeldifferenzierung zu. So ist MLP an der Muskeldifferenzierung beteiligt und kommt vermehrt in langsamen, oxidativen Fasern, als in schnellen, glykolytischen Fasern vor (385, 388, 389). Dieser Effekt kann auch durch eine künstliche langsam frequente Muskelstimulation erreicht werden (388).

Nach einem Herzinfarkt und bei Herzinsuffizienz kommt es zu Veränderungen in der MLP-Regulation. Nach einem Herzinfarkt wird MLP vermehrt in den Zellkern verschoben (27). Da dieser Effekt schon für andere Formen des Zellschadens beschrieben wurde, deckt sich dies mit den Erwartungen. Zudem wird jedoch auch die Expression von MLP im Herzmuskel nach Infarkt erhöht, ist aber bei Herzinsuffizienz deutlich reduziert, wobei jedoch die mRNA-Konzentration von MLP bei Herzinsuffizienz unverändert bleibt (29, 390, 391). Daraus ergibt sich, dass scheinbar die Stabilität von MLP im Herzen bei Herzinsuffizienz reduziert ist. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass MLP durch die Induktion der Calcineurin-NFAT-Achse einen schützenden Effekt beim Herzinfarkt zeigt (29). Ob und in wie weit die MLP-Aktivität bei einer Herzerkrankung auch am Skelettmuskel beeinträchtigt ist, wurde bislang nicht untersucht.

1.5.7 Titinkinase

Die Titinkinase ist eine eigenständige Kinasedomäne innerhalb des Titinproteins. Sie ist für die Muskelphysiologie essenziell und liegt zunächst autoinhibiert vor (31, 392). Sie wird in ihrer Aktivität durch Dehnung, Calcium und Calmodulin und Phosphorylierung gesteigert (392–394). Durch Dehnung kommt es dabei zu einer ATP-Bindung der Kinase und anschließend zu einer Autophosphorylierung des inhibitorischen Tyrosinrestes, was zu einer Aktivierung führt (394) (siehe Abb 1.5.7).

Sie interagiert mit Ubiquitinligasen und Apoptose-Pathways. Sie interagiert mit *nbr1*, das p62/SQSTM1 an das Sarkomer rekrutiert, welches wiederum mit MuRF2 interagiert (31). Bei motorischer Inaktivität, und damit vermeintlich reduzierter dehnungsabhängiger Aktivierung der Titinkinase, wird die Rekrutierung von MuRF2 an das Sarkomer gelöst und MuRF2 hemmt die Aktivität des *Serum response* Transkriptionsfaktors (SRF) im Zellkern (31). Letzter induziert ein

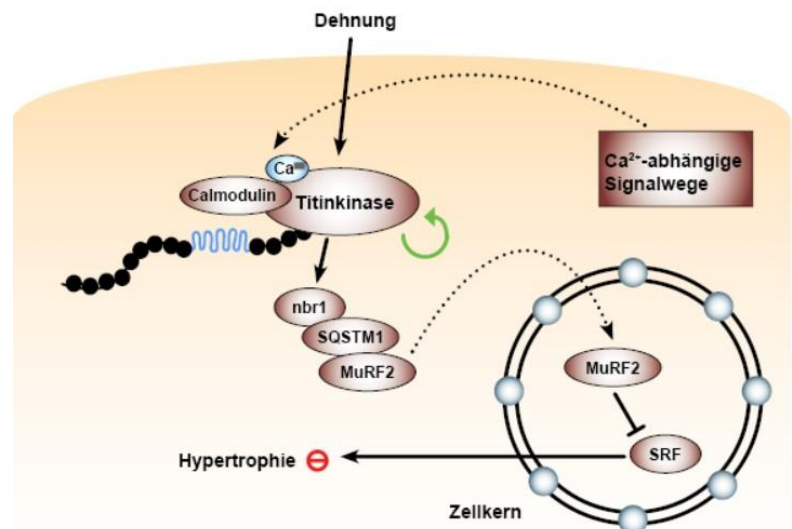


Abb. 1.5.7 Zelluläre Funktion der Titinkinase. Die Titinkinase wird dehnungsabhängig durch Autophosphorylierung in Gegenwart von Calcium (Ca²⁺) und Calmodulin aktiviert. Diese werden durch Ca²⁺-abhängige Signalwege induziert. Sie interagiert mit dem *neighbour of BRCA1 Gene Proteine 1* (*nbr1*), welches mit *Sequestosome-1* (SQSTM1) interagiert, das mit *muscle RING-finger protein-2* (*MuRF2*) interagiert. MuRF2 kann in den Zellkern translozieren und dort den *Serum response* Transkriptionsfaktor (SRF) hemmen, der seinerseits die muskuläre Hypertrophie stimuliert, die somit ebenfalls gehemmt wird.

Hypertrophie-induzierendes Expressionsmuster (395), sodass eine Hemmung eine Atrophie begünstigt.

Auch MuRF1 interagiert mit Titin in der Nähe der Kinasedomäne (32). Der MuRF1-Titinkomplex kann die Proteinsynthese hemmen, die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität steigern, die Expression von Proteinen im Apoptose-Signalweg steigern und eine Muskelschwäche auslösen (32, 33). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus Titin und MuRF1 an der Vermittlung von Skelettmuskelatrophie bei Herzinsuffizienz im Rahmen der kardialen Kachexie beteiligt ist und diese durch eine Hemmung der Komplexbildung gelindert werden kann (33). Es lässt sich vermuten, dass auch dieser Komplex physiologischerweise einen inaktivitätsinduzierten Muskelabbau vermitteln soll. Die kürzlich nachgewiesene Veränderung dieses Weges im Skelettmuskel bei Herzerkrankung lässt vermuten, dass das Titinprotein nicht nur als Zielstruktur von Veränderungen im Rahmen der Muskelschwäche betroffen ist, sondern womöglich eine Rolle bei der Vermittlung dieser Pathologie spielen könnte.

1.5.8 Pathologische Veränderungen am Herzen

Für das Verständnis der Pathologien am Titinprotein im Skelettmuskel im Rahmen eines Herzinfarktes oder bei einer Herzinsuffizienz könnten die bereits bestehenden Erkenntnisse über Veränderungen des Titinproteins am Herzen nützlich sein. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass die bisher herausgearbeiteten möglichen Pathomechanismen oftmals Analogien eines pathologisch veränderten Skelettmuskelstoffwechsels zum pathologisch veränderten Herzmuskelstoffwechsel darstellen.

Am Herzen ist die Titinsteifigkeit nach Herzinfarkt und bei unterschiedlichen Herzinsuffizienzen durch Kardiomyopathien erhöht. Es kommt im Modell teilweise bereits nach 12 Wochen zu einer reduzierten Gesamttitin-Expression bei gesteigerter Titindegradation, was vermeintlich zur Herzinsuffizienz beiträgt (396, 397).

Bezüglich der titinvermittelten Steifigkeit gibt es unterschiedliche Befunde. Teilweise wird eine vermehrte Expression des längeren N2BA-Titins beschrieben, was mit einer dilatativen Kardiomyopathie und einer verminderten passiven Steifigkeit der Herzmuskelzellen einherging (372). In anderen Modellen kam es zu einer vermehrten Expression von kürzerem N2B-Titin bei einer erhöhten passiven Steifigkeit (14, 396, 398, 399). Zusammengefasst werden könnten diese unterschiedlichen Befunde unter der Beobachtung von Makarenko et al., dass es in jedem Fall zu einer vermehrten Varianz der Befunde und daraus folgend zumindest in jedem Fall zu einer Form von Regulation kommt (400). Diese Befunde entstanden jedoch gänzlich in einer Betrachtung später mechanischer Veränderungen, also Veränderungen im Rahmen einer ausgeprägten funktionalen Herzinsuffizienz. Daten zur frühen postischämischen Mechanik sowie der Titinexpression beziehungsweise Modifikation liegen bislang nicht vor.

Zudem ist bei Herzinsuffizienz die Funktion des Frank-Starling-Mechanismus eingeschränkt. Bei Herzinsuffizienz entwickelt der Herzmuskel eine geringere aktive Kraft bei Vordehnung (401). Diese Beobachtung deckt sich vor dem Hintergrund der bereits erläuterten Mechanismen besonders gut mit der Expression längerer, weniger steifer Titinisoformen bei Herzinsuffizienz.

Bei Herzinsuffizienz kommt es zudem zu einer Veränderung der Titinphosphorylierung, was ebenfalls die Mechanik beeinflusst. So ist N2B-Titin an der N2B-Region und Serin 12022 in der PEVK-Region weniger phosphoryliert, während Serin 11878 in der PEVK-Region vermehrt phosphoryliert ist, was insgesamt die passive Steifigkeit der Zellen erhöht (14, 15, 34, 402). In einer anderen Untersuchung war dagegen auch die Phosphorylierung an Serin 12022 nach einem Herzinfarkt gesteigert (34). Hier war die gesteigerte Phosphorylierung von Serin 11878 und 12022 jedoch nur in der Frühphase zu beobachten und normalisierte sich rasch wieder (34). Im darauffolgenden Verlauf kam dann der Proteindegredation von Titin und der Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems eine größere Bedeutung zu (34).

Interessanterweise war am Herzen für die vermehrte PEVK-Phosphorylierung eine vermehrte IL-6 Sekretion der Herzmuskelzellen notwendig (34, 403). Zudem ist bekannt, dass die PKG-abhängige Phosphorylierung sowohl von N2B- als auch von N2BA-Titin bei Herzinsuffizienz vermindert ist

(355). Die vermehrte Phosphorylierung von Serin 11878 in der PEVK-Region kann bei Herzinsuffizienz auf die PKC zurückgeführt werden (14, 15, 34). Deren Aktivität steigt insbesondere in der Frühphase nach einem Infarkt, korrespondierend mit der PEVK-Phosphorylierung an, und normalisiert sich dann wieder (34). Andere Kinasen, die Titin modifizieren könnten, für die eine veränderte Aktivität nach Herzinfarkt nachgewiesen wurde, sind die CamKII, deren Aktivität erhöht ist, und die Erk1/2, deren Aktivität vermindert ist (34, 404). Ob diese Veränderungen jedoch auch tatsächlich eine veränderte Titinphosphorylierung am Herzen im Rahmen einer Herzerkrankung verursachen, wurde bislang nicht untersucht.

Weitere Veränderungen, die im Zusammenhang mit Titin bei Herzerkrankungen gezeigt werden konnten, sind vermehrte Disulfidbrücken und eine Induktion der Expression von MARP. Die Disulfidbrücken treten dabei in der N2B-Region auf und erhöhen die Steifigkeit des Proteins (405). Bei einer dilatativen Kardiomyopathie werden vermehrt CARP, DARP und ankrd2 gebildet, was ebenfalls mit einer erhöhten passiven Zellsteifigkeit einhergeht (372).

Ob sich die hier dargestellten Veränderungen in ähnlicher Weise im Skelettmuskel bei Herzerkrankung finden, ist bislang unklar.

1.6 Diabetes mellitus und Glucosestoffwechsel

1.6.1 Übersicht

Auch der Glucosestoffwechsel und dessen Veränderungen im Rahmen des Diabetes mellitus beeinträchtigen die Muskelfunktion. Zudem sind zahlreiche Wechselwirkungen zwischen einem Diabetes mellitus und Herz- bzw. Gefäßerkrankungen bekannt. Im Folgenden werden relevante Veränderungen des Muskelstoffwechsels bei Diabetes mellitus vorgestellt und vor der Fragestellung eines Einflusses auf die Muskelfunktion bei Herzerkrankung wesentliche Interaktionen erläutert.

1.6.2 Diabetische Muskelpathologie

Eine Beeinträchtigung der Skelettmuskelfunktion bei Diabetes mellitus ist bekannt. Diese korreliert mit der Krankheitsdauer und mit einer schlechten Blutzuckereinstellung (10, 406). Es ist zudem bekannt, dass die Muskelschwäche ihre Ursache in den Muskelzellen selbst hat und kontraintuitiver Weise mit einer erhöhten Muskelmasse einhergeht (10, 407). Diskutiert werden in diesem Rahmen eine reduzierte oxidative Stoffwechselleistung der Muskulatur und intramuskuläre Fettablagerungen (10).

Es sind zwar auch viele neuronale Veränderungen beim Diabetes mellitus beschrieben, diese sind jedoch nicht alleinige Ursache der Muskelfunktionsstörung. Es ist bekannt, dass die Weiterleitung durch eine erhöhte Sensitivität der N-/L-Typ-Calciumkanäle beeinträchtigt, die präsynaptische Acetylcholinfreisetzung reduziert und die Funktion der Natrium-Kalium-ATPase (Na/K-ATPase) ebenfalls reduziert ist (408–410). Dennoch ist die motorische Antwort der Muskelzelle auf elektrische Stimulation direkt an der Zelle und auf elektrische Stimulation vermittelt über einen Nerven gleich (407). Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich also festhalten, dass eine beeinträchtigte Muskelzellfunktion selbst für die Muskelschwäche wesentlich ist.

Die Acetylcholinsensitivität der Muskelzellen ist bei Diabetes mellitus vermindert. Dabei sind die Rezeptoren selbst desensitiviert und können auch nicht durch eine Inhibition der Proteinkinase C (PKC) wieder sensitiviert werden (411). Intrazellulär kommt es zu einer Mitochondrienschwellung und Defekten im T-Tubuli-System (412). Die elektrochemische Transduktion ist also gestört.

Zudem ist beim Diabetes mellitus der muskelzelluläre Calciumstoffwechsel beeinträchtigt. Die intrazelluläre Calciumkonzentration ist erhöht, was die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum im Rahmen physiologischer Prozesse beeinträchtigen könnte (413–415). Die Aktivität der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase ist erhöht (416). Die Calciumsensitivität der einzelnen Muskelzellen ist im *Musculus soleus* (M. soleus) erhöht (406).

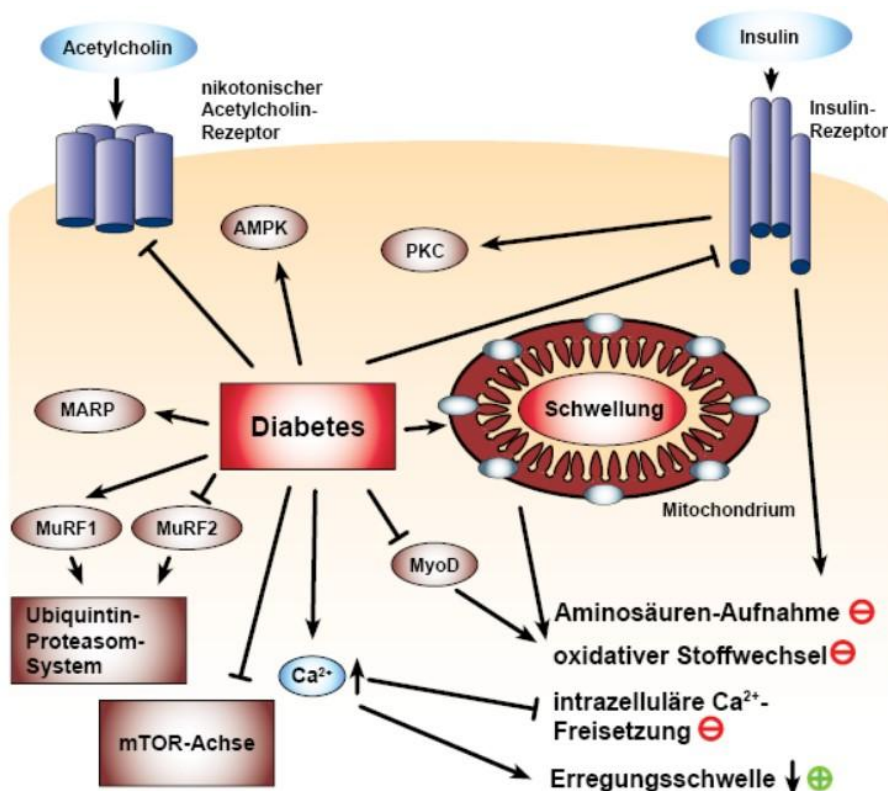


Abb. 1.6.1 Einfluss eines Diabetes mellitus auf den skelettmuskulären Stoffwechsel. Ein Diabetes hemmt die Sensitivität des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors für Acetylcholin und die des Insulinrezeptors für Insulin, wobei Letzterer die zelluläre Aminosäure-Aufnahme stimulieren würde, die somit bei einem Diabetes herabgesetzt ist. Zudem aktiviert der Insulinrezeptor die Proteinkinase Ca (PKC), die somit bei einem Diabetes ebenfalls vermindert aktiv ist. Es kommt zudem zu einer Mitochondrienschwellung, die die Aktivität des oxidativen Stoffwechsels hemmt. Zudem kommt es zu einer synergistischen Hemmung des Transkriptionsfaktors Myogener Faktor 3 (MyoD), der eigentlich den oxidativen Stoffwechsel stimulieren würde. Zudem steigt beim Diabetes die zytosolische Calciumionenkonzentration (Ca^{2+}), was die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung hemmt und die Erregungsschwelle herabsetzt. Zudem kommt es zu einer Hemmung der *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR)-Achse und zu Veränderungen in der Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems mit einer Steigerung der Aktivität von *muscle RING-finger protein-1* (*MuRF1*) und einer reduzierten Aktivität von *muscle RING-finger protein-2* (*MuRF2*). Zudem kommt es zu einer Induktion spezifischer *Muscle ankyrin repeat Proteine* (MARP)

Zudem wird auch die Fasertypenexpression durch den Diabetes mellitus beeinträchtigt. Während schnelle, glykolytische Fasertypen atrophieren, kommt es zu einer vermehrten Bildung von langsam, oxidativen Typ I Fasern (422). Dies geht einher mit einer reduzierten Expression von MyoD, der bekanntermaßen für die Induktion von schnellen, glykolytischen Fasertypen notwendig ist (419). Der Befund deckt sich mit der Beobachtung, dass die diabetische Muskelschwäche schnelle Muskeln stärker betrifft als langsamere (406, 423).

Ferner ist beim Diabetes mellitus die Aktivität der $\text{PKC}\alpha$ und der AMPK beeinträchtigt. Im Herzmuskel bei Diabetikern ist die $\text{PKC}\alpha$ -Aktivität erhöht (424). Da Insulin die $\text{PKC}\alpha$ -Aktivität im Skelettmuskel stimulieren kann (115), könnte eine Beeinträchtigung des Insulin-Haushaltes auch hier einen Einfluss nehmen. Dies würde seinerseits eine Modifikation der Muskelmechanik nach sich ziehen, da die $\text{PKC}\alpha$ an deren Regulation beteiligt ist (siehe Kapitel 1.3.7). Die Aktivität der AMPK im Skelettmuskel ist bei Diabetes erhöht und wird bei mechanischer Belastung stärker gesteigert als bei Gesunden (418, 420) (siehe Abb 1.6.1). Die AMPK ist entscheidend an der Regulation der

Es kommt im Rahmen des Diabetes mellitus zu weitreichenden Veränderungen der Transkription, die eine Muskelatrophie begünstigen. Während unterschiedliche wachstumsinduzierende Enzyme sowie die mTOR-Achse herunterreguliert werden, kommt es zu einer Hochregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems (417, 418). Diese erfolgt jedoch spezifisch durch eine Hochregulation von MuRF1, während MuRF2 herunterreguliert wird (419). Dies könnte also eine differenzierte Proteindegradation nach sich ziehen. Die Ubiquitinierung nimmt zudem bei körperlicher Belastung verglichen mit Gesunden vermehrt zu (420). Da Insulin physiologischerweise die Aminosäureaufnahme und Proteinsynthese stimuliert, könnte auch dies beim Diabetes mellitus beeinträchtigt sein (421).

Muskeltrophie beteiligt und könnte somit diese und damit sekundär auch die Muskelmechanik beeinträchtigen (siehe Kapitel 1.3.8).

Außerdem ist auch eine Beeinträchtigung der Phosphorylierung von Titin und dessen Bindungspartnern bekannt. Am Herzen ist die passive Steifigkeit von Titin bei Diabetes mellitus gesteigert, obwohl es zu einer vermehrten Expression des längeren N2BA-Titins kommt (424). Die Phosphorylierung der PEVK-Region an Serin11878 zeigte sich hier erhöht (424). Zudem ist im Skelettmuskel bekannt, dass bei Diabetes die Expression von Titin nicht beeinträchtigt ist, jedoch vermehrt bestimmte MARP exprimiert werden (419). Die tatsächliche proteomische Auswirkung dessen sowie deren Konsequenzen für die Skelettmuskuläre Mechanik sind bislang unbekannt und sollen im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet werden. Eine Überscheidende Betrachtung der Pathologien eines Diabetes mellitus auf der einen Seite und einer Herzmuskelischämie auf der anderen Seite lässt erstmals eine Betrachtung des sich hieraus ergebenden Interaktionspotentials zu und kann dazu beitragen, die Analogien dieser beiden Erkrankungen zu verstehen.

1.6.3 Wechselwirkungen mit Herzerkrankungen

Im Bezug auf die Funktion und den Stoffwechsel von Skelettmuskeln sind unterschiedliche Interaktionen zwischen Herzkreislauferkrankungen und einem Diabetes mellitus bekannt.

So ist sowohl bei der Herzinsuffizienz als auch bei der altersbedingten Sarkopenie die insulinabhängige Glucoseaufnahme im Skelettmuskel reduziert. Während bei der Sarkopenie der Insulinsignalweg selbst gestört ist, ist dieser bei der Herzinsuffizienz im Skelettmuskel nicht beeinträchtigt (72, 93, 108, 425). Der Effekt tritt im Tiermodell vier Wochen nach Ischämie mit anschließender Reperfusion (IR) auf und scheint zum Teil auf oxidativen Stress im Skelettmuskel zurückzuführen zu sein (71). Teilweise könnte jedoch auch der Cortisonspiegel eine Rolle spielen. Dieser ist bei der Sarkopenie erhöht und reduziert die Insulinsensitivität (11, 128, 426).

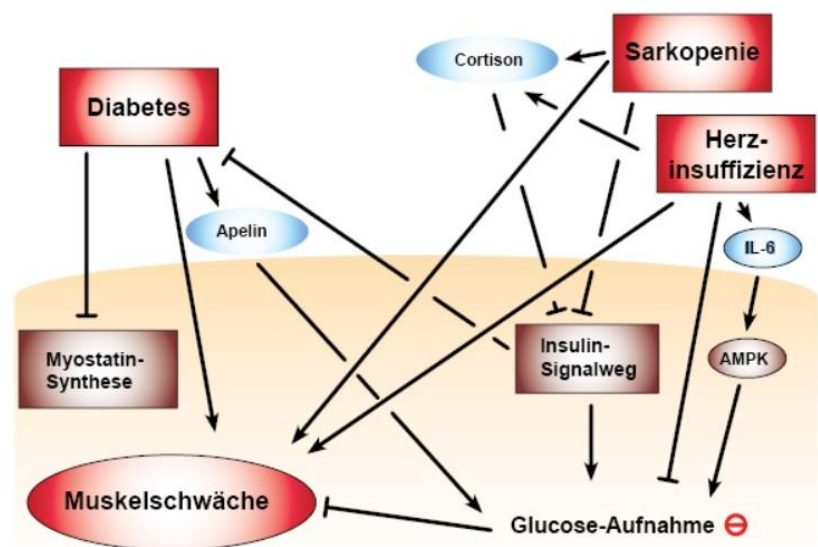


Abb. 1.6.2 Wechselwirkungen zwischen *Diabetes mellitus* (Diabetes), der Herzinsuffizienz und der Sarkopenie am Skelettmuskel. Ein Diabetes hemmt die Myostatin-Synthese und führt zu einer vermehrten Muskelschwäche. Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Apelin-Aktivität, die ihrerseits die Glucose-Aufnahme steigert. Ein intakter Insulinsignalweg würde einem Diabetes entgegenwirken, aber genau dieser wird durch die Sarkopenie eingeschränkt. Zudem kommt es sowohl bei der Sarkopenie als auch bei der Herzinsuffizienz zu einer vermehrten Cortison-Bildung, die ihrerseits ebenfalls die Aktivität des Insulinsignalweges hemmt. Bei der Herzinsuffizienz kommt es zudem zu einer Rekrutierung der Angiotensin-Achse, die ebenfalls einen Einfluss auf die zelluläre Glucoseaufnahme nimmt. Bei der Herzinsuffizienz kommt es außerdem zu einer reduzierten Glucose-Aufnahme im Skelettmuskel und zu einer vermehrten Aktivierung von Interleukin-6 (IL-6). Dieses stimuliert die Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase (AMPK), welche die Glucoseaufnahme erhöht

Vice versa zeigt sich jedoch auch die Muskelschwäche bei Herzinsuffizienzpatienten ausgeprägter, wenn zusätzlich eine Insulinresistenz vorliegt (11, 72).

Auch mit einigen Signalstoffen mit Relevanz im Rahmen der Herzinsuffizienz zeigen sich Wechselwirkungen mit dem Diabetes mellitus. Die skelettmuskuläre Expression von Myostatin ist bei

Diabetes mellitus reduziert (419), hingegen ist der Apelinspiegel bei hyperinsulinämen Diabetes erhöht (115, 427). Hierbei könnte es sich um einen pathologieinternen Kompensationsmechanismus handeln, denn Apelin verbessert über eine vermehrte Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonooxid-Synthase (eNOS) und der AMPK die skelettmuskuläre Glucoseaufnahme und regt die Fettsäureoxidation an (113, 137, 303). Dennoch könnte dies wie oben erläutert auch Einfluss auf die Muskelfunktion nehmen.

Auch die für die Herzinsuffizienz relevante Angiotensin-Achse und IL-6 greifen in den skelettmuskulären Glucosestoffwechsel ein. So erhöht eine Aktivierung der ACE2-Ang1-7-MasR-Achse die skelettmuskuläre Glucoseaufnahme, während eine Aktivierung der ACE/ATII/AT1R-Achse sie reduziert (166). IL-6 induziert die AMPK und erhöht so ebenfalls die Glucoseaufnahme (137) (siehe Abb. 1.6.2).

Zusammenfassend scheinen sich also die Krankheitsbilder des Diabetes mellitus und der Herzinsuffizienz auf zum Teil komplexen Wegen gegenseitig zu beeinflussen. Vor diesem Hintergrund bietet sich also die interessante Fragestellung, ob die Interaktion dieser Pathologien auch im Kontext des Titinproteins eine Rolle spielen könnte.

1.7 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen erstmals Veränderungen des Titinproteins im Skelettmuskel ausgelöst durch eine Myokardischämie und bei Diabetes mellitus betrachtet werden.

Als Modell für eine Herzerkrankung dient ein Infarktmodell mit einer Koronararterienligatur bei Mäusen. Stellvertretend für unterschiedlich lokalisierte, in ihren Fasertypen verschieden zusammengesetzte und anders beanspruchte Muskeln sollen mehrere verschiedene Skelettmuskeln betrachtet werden. Dabei fiel die Wahl auf den Musculus psoas, den Musculus tibialis anterior, den Musculus gastrocnemius, den Musculus soleus und den Musculus extensor digitorum longus.

Zunächst sollen in den Muskeln Musculus psoas und Musculus tibialis anterior mechanische Veränderungen betrachtet und charakterisiert werden. Dabei ist sowohl die passive Muskelmechanik, insbesondere vor dem hierfür entscheidenden Einfluss des Titin-Proteins relevant, als auch die aktive Muskelmechanik, da diese als symptomatisch entscheidend für eine Muskelschwäche zu betrachten ist.

Des Weiteren sollen in einem ersten Ansatz zur Eingrenzung möglicher Signalwege mit Einfluss auf die Titinmechanik die Titinphosphorylierung und die Aktivierung und Expression bestimmter Kinasen vor dem Hintergrund des Infarktes in unterschiedlichen Skelettmuskeln betrachtet werden. Hierbei fiel die Wahl einerseits auf die PKC α , für die wie oben beschrieben innerhalb des Herzens eine entscheidende Bedeutung in der frühen Modifikation von Titin nach einem Herzinfarkt bekannt ist. Andererseits soll die AMPK als regulierbarer und für die Muskeltrophie entscheidender Energiesensor der Muskelzelle näher betrachtet werden.

Aufgrund der Relevanz des Diabetes mellitus insbesondere im Hinblick auf Erkrankungen des Herzkreislaufsystems und auf eine Muskelschwäche, sollen zudem die oben beschriebenen Veränderungen vergleichend zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren betrachtet werden. Als Diabetes-Modell dient hier ein murines Modell mit Leptin-Rezeptor-Defizienz auf Grundlage einer Spontanmutation.

Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollen zum besseren Verständnis der Muskelschwäche bei Herzerkrankung beitragen und der Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zurarbeiten. Einige bisherige Ansätze und mögliche Implikationen der hier erhobenen Befunde werden in der Diskussion erläutert.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial und Präparation

Um eventuelle Veränderungen im Skelettmuskel nach Herzinfarkt zu adressieren, wurden Maus-Modelle für die Simulation einer Myokardischämie und eines Diabetes mellitus verwendet.

Die dabei verwendeten Muskelproben stammen von männlichen C57BL6/J Mäusen von Charles River. Es wurden zwei Genotypen verwendet. Der eine Genotyp wies eine heterozygote Leptinrezeptordefizienz (dB+) auf, der andere eine Homozygote (dBdB). Dies entspricht einem gängigen Modell für den menschlichen Diabetes mellitus (428, 429). Es wurden jeweils drei Tiere als *sham*-Kontrolle (*sham*) behandelt, und zehn Tiere erhielten im Alter von zehn bis zwölf Wochen eine Myokardischämie-Behandlung (*IR*). Bei letzteren Tieren wurde über einen implantierten Faden, der operativ um ein Herzkranzgefäß, den Ramus interventricularis anterior, gelegt wurde, eine Ischämie im Herzmuskel induziert. Nach 45-minütigem Gefäßverschluss wurde durch ein Lösen der Schlaufe eine Reperfusion eingeleitet. Dieser Tierversuch erfolgte unter Verantwortung und Aufsicht von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Schmitt und Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger entsprechend des genehmigten Tierversuchsvorhabens (LANUV Az. AZ 84-02.04.2017.A145) durch Herrn Dominik Semmler und Frau Dr. rer. nat. Simone Gorresen im ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland). Ein dBdB-Tier verstarb nach dem Eingriff. Die Tiere für die *Sham*-Behandlung, bei denen lediglich eine Fadenimplantation, jedoch keine anschließende Ischämieinduktion erfolgte, stammten von Charles River (Wilmington, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika).

Die Präparation der Mäuse erfolgte zwölf Tage nach der Behandlung und wurde von Herrn Dr. rer. nat. David Barbosa, Frau Sabine Bongardt und Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt betrug das Alter der Tiere zwischen neun und zwölf Wochen. Dafür wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Organentnahme der Herzen und der in dieser Arbeit verwendeten Muskelproben. Dabei wurden bei allen Tieren Proben aus dem *Musculus psoas* (*M. psoas*), dem *Musculus tibialis anterior* (*M. tibialis ant.*), dem *Musculus gastrocnemius* (*M. gastrocnemius*), dem *Musculus soleus* (*M. soleus*) und dem *Musculus extensor digitorum longus* (*M. EDL*) entnommen. Für die biochemischen Versuche wurden die Proben in ein Reaktionsgefäß überführt und mithilfe flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Die anschließende Lagerung bis zur Bearbeitung erfolgte bei -80 °C. Zusätzlich wurden für die biomechanischen Messungen Proben von *M. psoas* und *M. tibialis ant.* auf einem in einer Sechs-Well-Platte ausgebrachten Silikonboden mit Fixationsnadeln fixiert und in Glycerinfixationslösung bei -20 °C gelagert.

2.2 Verwendete biologische Reagenzien

Die folgenden Tabellen fassen die Substanzen biologischen Ursprungs, die im Rahmen der Versuche dieser Arbeit verwendet wurden, zusammen (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2).

| Zielstruktur | Organismus | Isotyp | Klonalität | Verwendete Verdünnung | Bezeichnung/Artikelnummer | Hersteller | Ort |
|--|------------|--------|------------|--------------------------------|--|--------------------|-----------------------------------|
| Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase (AMPK) | rb | IgG | mono | 1: 5 000 | Anti-AMPK α 1 + AMPK α 2 antibody [EPR19549] | Abcam | Cambridge, Vereinigtes Königreich |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) | m | IgG | mono | 1: 10 000 oder 1: 20 000 | Clone GAPDH-71.1 (G8795) | Sigma-Aldrich, CO. | Israel |

| | | | | | | | |
|---|----|-----|------|----------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| Kaninchen-IgG | g | HRP | poly | 1:20000 (PKC), 1:5000 (AMPK), | <i>Polyclonal Antibody to Rabbit IgG [H&L]-HRP (R1364HRP)</i> | Acris Antibodies GmbH | Herford, Deutschland |
| Maus-IgG | h | HRP | poly | 1:10 000 (GAPDH) | <i>Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7076)</i> | Cell Signaling Technologies | Leiden, Niederlande |
| PEVK-Titin | rb | | poly | 1: 10 000 | PEVK (EP113200) | Kaneka Eurogentec S.A. Biologics Division | Liege, Belgien |
| Phospho -Serin-12022-PEVK-Titin | rb | | poly | | PEVKS12022 <i>human</i> (EP113201) | Kaneka Eurogentec S.A. Biologics Division | Liege, Belgien |
| Phospho-Serin-660-Proteinkinase C (PKC) | rb | IgG | mono | 1:50 000 | Anti-PKC (phospho S660) <i>antibody</i> [EP1902Y] ab75837 | Abcam | Cambridge, Vereinigtes Königreich |
| Phospho-Threonin-172-Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase (AMPK) | rb | | poly | 1: 2 000 | Phospho-AMPK-A (Thr172) (#2531) | Cell Signaling Technologies | Leiden, Niederlande |
| Proteinkinase C α (PKC α) | rb | IgG | mono | 1: 10 000 | <i>Anti-PKC α antibody</i> [Y124] ab32376 | Abcam | Cambridge, Vereinigtes Königreich |

Tabelle 1: Für die Experimente dieser Arbeit verwendete Antikörper. Spalte 1 gibt die Zielstruktur an, Spalte 2 den Organismus, aus dem der Antikörper stammt (rb= Hase, m= Maus, g= Ziege, h= Pferd). Spalte 3 gibt die Antikörperart an, falls vorhanden (IgG= Immunglobulin G, HRP= *Horse raddish peroxidase*-gekoppelt). Spalte 4 gibt die Klonalität der Antikörper an (mono= monoklonal, poly= Polyklonal). Spalte 5 gibt die verwendete Verdünnung an, also das Verhältnis, in dem die Konzentration des Antikörpers in der Herstellerkonzentrierung zu der im verwendeten Medium steht). Spalte 6 gibt die Herstellerbezeichnung des Antikörpers an sowie die Artikelnummer. Spalte 7 gibt die herstellende Firma an und Spalte 8 Region der Herstellung

| Substanz | Produkt-Bezeichnung | Hersteller | Ort |
|----------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Bandenmarker | PageRuler™ (#26619) | Thermo Scientific | Vilnius, Litauen |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | BSA-1T | Capricorn Scientific GmbH | Ebsdorfergrund, Deutschland |

Tabelle 2: Für die Experimente dieser Arbeit verwendete biologische Substanzen. Spalte 1 gibt den Substanznamen an, Spalte 2 die Produktbezeichnung durch den Hersteller. Spalte 3 gibt die herstellende Firma an und Spalte 4 die Region der Herstellung. Antikörper finden sich in Tabelle 1.

2.3 Verwendete chemische Reagenzien

Die folgenden Chemikalien wurden in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Protokollen entweder direkt verwendet, oder dienten zur Erstellung der Lösungen, die in der Arbeit Verwendung fanden (siehe Tabelle 3).

| Substanz | Produkt-Bezeichnung | Hersteller | Ort |
|--|--|------------------------------------|--|
| 2,3-Butanedionmonoxid (BDM) | B0753-25G | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| 2-Mercaptoethanol | 2-Mercaptoethanol (M3148-250ML) | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| 6-Aminocapronsäure | A2504-100G | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Acrylamid (29:1) | 30% Acrylamid/Bis (#1610156) | Bio-Rad Laboratories, Inc. | Shanghai, China |
| Acrylamid (37,5:1) | Rotiphorese® Gel 30 (3029.1) | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Agarose | Biozym LE Agarose | Biozym Scientific GmbH | Oldendorf, Deutschland |
| Ammonium-Persulfat (APS) | A3678-100G | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Bradford Reagenz | B6916-500ML | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Dithiothreitol (DTT) | #D0632 | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Elastosil A | #2146290001A | Kahmann & Ellerbrock GmbH & Co. KG | Bielefeld, Deutschland |
| Elastosil B | #2146290001B | Kahmann & Ellerbrock GmbH & Co. KG | Bielefeld, Deutschland |
| Essigsäure | Essigsäure Rotipuran® 100%, p.a. (3738.5) | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol (absolut) | AnalaR NORMAPUR | VWR Chemicals | Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure | <i>Ethylene-Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetic acid (E4378-100G)</i> | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Glycerol | Glycerol (G5515-500mL) | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Glycin | Glycin #3187 | Carl Roth GmbH + | Karlsruhe, |

| | | | |
|--|---|------------------------------|---|
| | | Co. KG | Deutschland |
| Guanidin-Hydrochlorid | Guanidine Hydrochloride pure (144229.1214) | AppliChem GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| HRP-Reagenz Lösung A | Immobilon®ECL Ultra Western HRP Substrate (CS222619) | Merck Chemicals GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| HRP-Reagenz Lösung B | Immobilon®ECL Ultra Western HRP Substrate (CS222618) | Merck Chemicals GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| Igepal® | Igepal® CA-630 (I3021-100ML) | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Imidazol | Imidazole (I5513-100G) | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Imperial™ Protein Stain | TI271243 | Thermo Fisher Scientific | Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Isopropanol | 11193479 | Otto Fischar GmbH und Co. KG | Saarbrücken, Deutschland |
| Kaliumhydroxid | Honeywell Fluka™ Potassium Hydroxide Solution, 1.0M, (#1310-58-3) | Fisher Scientific Oy | Vantaa, Finnland |
| Kaliumphosphat | Potassium phosphate monobasic (P9791-100G) | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Kalziumchloridlösung | Honeywell Fluka™ Calcium Chloride Solution | Fisher Scientific Oy | Vantaa, Finnland |
| Magnesiumdichlorid (MgCl) -hexahydrat | Magnesium chloride hexahydrate M2293-100G | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Methanol | 32213-2.5L-M | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Natrium-Magnesium-Adenosin-Triphosphat (NaMgATP) | Adenosine 5'-Triphosphoric Acid Disodium Salt (A1348,0025) | AppliChem GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | P029.3 | Carl Roth GmbH + | Karlsruhe, |

| | | | |
|------------------------------------|---|----------------------------|-------------------------|
| | | Co. KG | Deutschland |
| Natriumcreatinphosphat | <i>Creatine Phosphate, Disodium Salt</i> (2380-25GM) | Merck Chemicals GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumhydroxid | 6771.3 | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | 0183.3 | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Phosphatase-Inhibitor-Cocktail A+B | B15002 | Absource Diagnostics GmbH | München, Deutschland |
| Protease Inhibitor 2 | cOplete™ Protease Inhibitor Tabletten (#1187358001) | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Protease-Inhibitor-Cocktail | B14002 | Absource Diagnostics GmbH | München, Deutschland |
| Salzsäure | Salzsäure Rotipuran® 100%, p.a., ISO (P074.4) | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Serva Blue R | 35051.02 | SERVA Electrophoresis GmbH | Heidelberg, Deutschland |
| Temed | TEMED (A1148,0100) | AppliChem GmbH | Darmstadt, Deutschland |
| Thiourea | T8656-500G | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Tricin | Tricin Pufferan® (6977.3) | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Tris | TRIS Pufferan® (AE15.3) | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Triton™ | Triton™ X-100 (T8787-50ML) | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Tween® 20 | P1379-500ML | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Urea | 1.08488.1000 | Merck Chemicals GmbH | Darmstadt, Deutschland |

Tabelle 3: Für die Experimente dieser Arbeit verwendete chemische Substanzen. Spalte 1 gibt den Substanznamen wie er in dieser Arbeit Verwendung findet an, Spalte 2 die Produktbezeichnung durch den Hersteller. Spalte 3 gibt die herstellende Firma und Spalte 4 die Region der Herstellung an

2.4 Verwendete Lösungen

Die folgenden Lösungen und Puffer wurden in Rahmen dieser Arbeit verwendet und innerhalb der Arbeitsgruppe hergestellt (siehe Tabelle 4).

| Name | Zusammensetzung |
|--|--|
| Adenosin-Triphosphat (ATP)-Lösung | 50mM Natrium-ATP und 50mM Magnesiumdichlorid-hexahydrat wurden in vollentsalztem Wasser gelöst; der pH-Wert wurde langsam mit Kaliumhydroxid auf 7,0 eingestellt; die Lösung wurde in 20ml-Einheiten aliquotiert und bei -20°C gelagert. |
| Agaroselösung | 1,5% Agarose wurden in vollentsalztem Wasser gelöst; dazu wurde die Lösung in einer Mikrowelle erhitzt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. |
| Aktivierungslösung | <p>Wässrige Lösung mit 10mM Imidazol, 3mM Ca-EGTA, 10mM NaMgATP, 3mM MgCl₂, 47,7 mM Natriumcreatinphosphat und 2mM DTT (1ml der Imidazol-Lösung, 1,2ml der Calcium-EGTA-Lösung, 20ml der ATP-Lösung, 3ml der Magnesiumdichloridhexahydrat-Lösung, 1,22 g Natriumcreatinphosphat und 200 µl der DTT-Lösung wurden vermischt) der pH-Wert wurde mit einmolarer Salzsäure oder einmolarer Natronlauge auf 6,85 eingestellt. die fertige Lösung wurde auf 10ml aliquotiert und bei -20°C gelagert;</p> <p>Vor der Messung wurde zu einem Aliquod 20µl DDT und jeweils 100µl Phosphatase-Inhibitor-Cocktail A, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail B und Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugefügt.</p> |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS)-Lösung | 438mM wurden in vollentsalztem Wasser gelöst. |
| Anodenpuffer | 300 mM Tris, 100mM Tricine; der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,8 eingestellt; anschließend erfolgte die Lagerung bei RT. |
| Dithiothreitol (DTT)-Lösung | 1M DTT wurde in vollentsalztem Wasser gelöst; die Lösung wurde auf 500µl-Aliquots aufgeteilt und diese dann in einem nächsten Schritt auf 20µl-Aliquots aufgeteilt. |
| Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)-Lösung | 250mM EGTA und 500mM Kaliumchlorid wurden in vollentsalztem Wasser gelöst; der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid auf 7,0 eingestellt; anschließend wurde die Lösung bei 4°C gelagert. |
| Glycerinfixationslösung | Ein Puffer mit 75mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan- |

| | |
|-------------------------------------|--|
| | hydrochlorid (TRIS-HCl), 2mM Magnesiumchlorid und 2mM EGTA in vollentsalztem Wasser wurde im pH-Wert auf 7,1 eingestellt; dann wurden 24,5 mL Puffer mit 24,5 ml Glycerol und 1ml cOmplete™ Protease Inhibitor gemischt und anschließend verwendet. |
| Imidazolösung | 1M Imidazol wurde in VE-Wasser gelöst; die Lösung wurde bei 4°C gelagert. |
| Kalium-Phosphat-Lösung | 100mM Kaliumphosphat und 100mM Natriumazid wurden in vollentsalztem Wasser gelöst, der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,0 eingestellt; anschließend wurde die Lösung bei 4°C gelagert. |
| Kalzium-EGTA-Lösung | 250mM EGTA wurde in 50mL vollentsalztem Wasser gelöst; der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid auf 8,0 eingestellt; dann wurden 12,5 ml 1M Kalziumchloridlösung hinzugegeben (insgesamt 250mM), anschließend wurde der pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 7,0 eingestellt; die Lösung wurde bei 4°C gelagert. |
| Kathodenpuffer | 300 mM Aminocaprinsäure, 30mM Tris; der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 8,7 eingestellt. |
| Laufpuffer | Stocklösung: 250mM Tris, 2M Glycin und 1% SDS wurden in vollentsalztem Wasser gelöst, der pH-Wert wurde kontrolliert und nur Lösungen mit pH>8,3 wurden verwendet; die Lagerung erfolgte bei RT; vor der Verwendung wurde die Lösung 1:10 mit vollentsalztem Wasser verdünnt und in einem Kanister gelagert. |
| Magnesiumdichloridhexahydrat-Lösung | 100mM Magnesiumdichloridhexahydrat wurden in vollentsalztem Wasser gelöst. |
| Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Destain | 10% Essigsäure, 40% Ethanol und 50% vollentsalztes Wasser wurden vermischt; anschließend erfolgte die Lagerung bei RT |
| Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Stain | 0,075% Serva Blue wurden in Methanol gelöst; anschließend erfolgte die Lagerung bei RT |
| Relaxationslösung | Wässrige Lösung mit 10mM Imidazol, 3mM EGTA, 10mM NaMgATP, 3mM MgCl ₂ , 47,7mM Natriumcreatinphosphat und 2mM DTT; (1ml der Imidazol-Lösung, 1,2ml der EGTA-Lösung, 20ml der ATP-Lösung, 3ml der Magnesiumdichloridhexahydrat-Lösung, 1,22 g Natriumcreatinphosphat und 200 µl der DTT-Lösung wurden gemischt) der pH-Wert wurde auf 6,85 mit einmolarer Salzsäure oder |

| | |
|--|---|
| | <p>einmolarer Natronlauge eingestellt; die fertige Lösung wurde auf 10ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.</p> <p>Vor der Messung wurde zu einem Aliquot 20µl DDT und jeweils 100µl Phosphatase-Inhibitor-Cocktail A, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail B und Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugefügt;</p> <p>Für die passiven Kraftmessungen wurden außerdem 3mg 2,3-Butanedionmonoxid (BDM) hinzugefügt.</p> |
| Sammelgelpuffer | 0,5M Tris und 0,4% SDS wurden in vollentsalztem Wasser gelöst und der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 6,8 eingestellt; anschließend erfolgte die Lagerung bei 4°C. |
| Silikonboden | Elastosol A+B wurden zu gleichen Teilen vermischt. |
| <i>Stripping</i> Puffer | 6M Guanidin-Hydrochlorid, 20mM Tris, 0,2% Igepal® m; der pH wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung wurde bei 4°C gelagert. Zum Anfang der Woche wurde ein frischer Aliquot entnommen mit 0,1M Mercaptoethanol versetzt und innerhalb einer Woche mehrfach verwendet |
| Titinprobenpuffer | 50mM Tris wurde in vollentsalztem Wasser im Wasserbad bei 60°C gelöst, der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt; 8M Urea, 2M Thiourea, 3% SDS, 0,035% Serva Blue und 10% Glycerol wurden hinzugegeben; die Lösung wurde unter Bewegung erkalten gelassen, anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert. |
| Trenngelpuffer | 1,5M Tris wurde in vollentsalztem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Salzsäure auf 8,8 eingestellt; anschließend wurden 0,4% Natriumlaurylsulfat (SDS) hinzugegeben und die Lösung wurde bei 4°C gelagert. |
| Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST) | Stocklösung: 0,2M Tris, 1,5M NaCl, 1% Tween-20 wurden in vollentsalztem Wasser gelöst; der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei RT; vor der Verwendung wurde die Lösung 1:10 mit vollentsalztem Wasser verdünnt und in einem Kanister gelagert. |

Tabelle 4: Für die Experimente dieser Arbeit verwendete Lösungen. Spalte 1 gibt die Bezeichnung der Lösung innerhalb dieser Arbeit an. Spalte 2 beschreibt die Zusammensetzung und Herstellung.

2.5 Materialien und Geräte

Die folgenden Materialien und Geräte wurden zur Durchführung der Protokolle, Lagerung oder Inkubation der Proben sowie zur Erstellung der verwendeten Lösungen verwendet (siehe Tabelle 5):

| Material | Artikelbezeichnung | Hersteller | Ort |
|-------------------------------|--|--|---|
| 0,2mL Reaktionsgefäß | <i>PCR Tubes</i> 0,2 mL (0030 124.332) | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| 0,5mL Reaktionsgefäß | <i>Safe-Lock Tubes</i> 0,5 mL (0030 120.023) | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| 1,5mL Reaktionsgefäß | Regiergefäß 1,5mL (72.690.001) | Sarstedt AG & Co. KG | Nümbrecht, Deutschland |
| 15mL Reaktionsgefäß | <i>Cellstar® Tubes</i> (188 271) | Greiner Bio-One International GmbH | Frickenhausen, Deutschland |
| 2mL Reaktionsgefäß | Regiergefäß 2mL (72.691) | Sarstedt AG & Co. KG | Nümbrecht, Deutschland |
| 50mL Reaktionsgefäß | <i>Cellstar® Tubes</i> (227 261) | Greiner Bio-One International GmbH | Frickenhausen, Deutschland |
| Binokularlupe 1 | Visiscope SB350H | VWR International s.r.l. | Milano, Italien |
| Binokularlupe 2 | Leica s8 apo | Leica Camera AG | Wetzlar, Deutschland |
| Biomechanische Messstation | McMyoskin | MyoTronic UG | Heidelberg, Deutschland |
| Blotting-Kammer | Trans-Blot® Turbo™ Transfer System | Kennedy Blvd. Bio-Rad Laboratories Inc. | München, Deutschland |
| Elektrophorese- Kammer | Mini-PROTEAN® Tetra System | Kennedy Blvd. Bio-Rad Laboratories Inc. | München, Deutschland |
| Fixationsnadeln | Austerlitz <i>Insect Pins</i> ® (Minutiens ø 0,1mm) | ENTOMORAVIA | Slavkov u Brna, Tschechien |
| Fixationsnadeln | Austerlitz <i>Insect Pins</i> ® (Minutiens ø 0,2mm) | ENTOMORAVIA | Slavkov u Brna, Tschechien |
| Gefrierschrank (- 20°C) | Ty 363044 (Seriennummer: 34.566.771.5) | Liebherr | Ochsenhausen, Deutschland |
| Gefrierschrank (- 80°C) | RLE40086V (Seriennummer: 149VR5C01M) | Thermo Scientific | Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Gelformen | Mini-PROTEAN® Tetra System | Kennedy Blvd. Bio-Rad Laboratories Inc. | München, Deutschland |
| Gel-Ständer | Mini-PROTEAN® Tetra System | Kennedy Blvd. Bio-Rad Laboratories Inc. | München, Deutschland |
| Gewebe-Kammer | Geschlossene Plexiglaskammer | Hauseigene Werkstatt des Universitätsklinikums Düsseldorf | Düsseldorf, Deutschland |
| Heizblock | Thermomixer <i>compact</i> 5350 | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Heizplatte 1 | IKA® RCT <i>basic safety</i> <i>control</i> | IKA®-Werke GmbH & CO. KG | Staufen, Deutschland |

| | | | |
|------------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Heizplatte 2 | 97042-686 6000 | VWR International GmbH | Langenfeld, Deutschland |
| Imager | Fusion FX | Vilber | Collégien, Frankreich |
| Kanüle | Sterican® | Braun Melsungen AG | Melsungen, Deutschland |
| Kühlschrank (4°C) | Typ 261964 (Seriennummer: 84.656.704.0) | Liebherr | Ochsenhausen, Deutschland |
| Küvetten | 100 REF 67.742 | Sarstedt AG & Co. KG | Nümbrecht, Deutschland |
| Linse für Binokularlupe 2 | Leica 10446335 | Leica Camera AG | Wetzlar, Deutschland |
| Membran | Roti®-PVDF, Porengröße 0,45µm (T830.1) | Carl Roth GmbH + Co. KG | Karlsruhe, Deutschland |
| Mikrowelle | Micromat 115 | AEG | Frankfurt, Deutschland |
| pH-Meter | MP220 pH-Meter | Mettler Toledo | Ohio, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Photometer | Ultrospec 1000 | Pharmacia Biotech | Uppsala, Schweden |
| Pinzette | Dumoxel 03 0103-4PO SN.858.49.2 | Manufactures D'Outils Dumont SA | Montignez, Schweiz |
| Pipetten | PIPETMAN Classic Starter Kit | Gilson International France | Villiers Le Bel, Frankreich |
| Pipetten | Research® Plus | Eppendorf AG | Hamburg, Deutschland |
| Rollbank 1 | IKA Roller 10 digital (0004013000) | IKA®-Werke GmbH & CO. KG | Staufen, Deutschland |
| Rollbank 2 | RM5-30V CAT | Ingenierbüro CAT, M. Zipperer GmbH | Staufen, Deutschland |
| Rollbank 2 | RM10W-30V CAT | Ingenierbüro CAT, M. Zipperer GmbH | Staufen, Deutschland |
| Schütteltisch | Shaker DOS-10L | NeoLab® Migge GmbH | Heidelberg, Deutschland |
| Schütteltisch 2 | Kombischüttler KL 2 | Edmund Bühler GmbH | Bodelshausen, Deutschland |
| Schütteltisch 3 | Kombischüttler SM 30 | Edmund Bühler GmbH | Bodelshausen, Deutschland |
| Signalverstärker | Signalverstärker | MyoTronic UG | Heidelberg, Deutschland |
| Skalpell | Feather disposable scalpel | Feather Safety Razor | Osaka, Japan |

| | | | |
|-----------------|--|---|----------------------------|
| | | Co., LTD. | |
| Spannungsquelle | <i>Standard Power Pack P25 T, Biometra Product Line</i> | Bio Sciences | Dublin, Irland |
| Spatel | Mini-PROTEAN® Tetra System | Kennedy Blvd. Bio-Rad Laboratories Inc. | München, Deutschland |
| Spritze | Injekt® LL 10 ml, Lock-Ansatz, zentrisch (4606728V) | Braun Melsungen AG | Melsungen, Deutschland |
| Taschenkämme | Mini-PROTEAN® Tetra System | Kennedy Blvd. Bio-Rad Laboratories Inc. | München, Deutschland |
| Vortexer 1 | Reax Top (541-10000-00) | Heidolph Instruments GmbH & CO. KG | Schwabach, Deutschland |
| Vortexer 2 | 444-1372 Vortex-Schüttler | VWR International GmbH | Langenfeld, Deutschland |
| Vortexer 3 | Vortex 2™ | Bender & Hobein AG | Zürich, Schweiz |
| Wasserbad | 3043 | Kötterman GmbH | Uetze, Deutschland |
| Well-Plate | Zellkultur Multiwellplatte, 6 WELL PS, TRANSP., CELLSTAR®, TC (657160) | Greiner Bio-One International GmbH | Frickenhausen, Deutschland |
| Whatman®-Paper | 2300916 | Sigma-Aldrich, CO. | St. Louis, Frankreich |
| Zentrifuge | Biofuge fresco Heraeus instruments | Heraeus Holding GmbH | Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge 2 | Mini Star Silverline | VWR International GmbH | Langenfeld, Deutschland |

Tabelle 5 Für die Experimente dieser Arbeit verwendete Materialien. Spalte 1 gibt die Materialbezeichnung wie sie in dieser Arbeit Verwendung findet an, Spalte 2 die Produktbezeichnung durch den Hersteller. Spalte 3 gibt die herstellende Firma an und Spalte 4 die Region der Herstellung.

2.6 Verwendete Software

Die folgenden Programme wurden zum Imaging der *Blots* und Gelfärbungen verwendet, zur Visualisierung der Kräfte in den biomechanischen Messungen, sowie zur Auswertung und zur Erstellung dieser schriftlichen Arbeit (siehe Tabelle 6).

| Verwendung | Programm | Version | Hersteller | Ort |
|---|------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| Ansteuerung der biomechanischen Messstation | Myodat | 1.0 | Heinrich-Heine Universität | Düsseldorf, Deutschland |
| Auswertung | Image Lab™ | 6.0.1 build 34 Standard Edition | ©2017, Biorad-Laboratories Inc. | Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika |

| | | | | |
|----------------------------------|---|--|-----------------------------------|---|
| Auswertung | GraphPad Prism | <i>Prism 9 for Windows 64-bit, Version 9.0.2 (161)</i> | ©1992-2021 GraphPad Software, LLC | Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Auswertung und Verschriftlichung | Microsoft® Office Excel® und Word® 2007 | (12.0.6787.5000) SP3 MSO (12.0.6785.5000) | Microsoft Corporation | Washington, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Imaging | Fusion FX6 Edge | 1.0 | Vilber | Collégien, Frankreich |
| Zitationsverwaltung | Citavi | <i>Citavi 6 for Windows Campus</i> | Swiss Academic Software | Wädenswil, Schweiz |

Tabelle 6 Für die Erstellung dieser Arbeit verwendete Software. Spalte 1 gibt den Verwendungszweck der Software an, Spalte 2 deren Bezeichnung. Spalte 3 die Version, falls vorhanden, Spalte 4 die herstellende Firma und Spalte 5 die Region der Herstellung

2.7 Biomechanik

2.7.1 Gewebepräparation

Die biomechanischen Messungen erfolgten als Einzelfaserkraftmessungen. Das für die Kraftmessung vorgesehene Gewebe wurde von der Präparation bis zur Messung in Glycerin-Fixationslösung bei -20 °C gelagert. Dabei waren sie durch Fixationsnadeln auf einem Agaroseboden unter leichter Spannung befestigt.

Die Faserhäutung als Vorbereitung für die Messung erfolgte in Anlehnung an Prado et al (7). Am Vortag der Messung wurde das Gewebe in eine Gewebekammer überführt und erneut durch Fixationsnadeln auf einem Agaroseboden fixiert. In diesem Gefäß wurde es mit einer 2,3-Butanedionmonoxid (BDM)-haltigen Relaxationslösung (RS) und einem Gehalt von 0,5% Triton über Nacht für circa 17 Stunden bei 4 °C auf einem Schütteltisch bei ca. 30rpm inkubiert. Das BDM diente dabei der Unterdrückung aktiver Kontraktionen in den Fasern (430) und ihrem Schutz vor Schaden durch diese (431). Die RS verhinderte ihrerseits Zelldepolarisationen an Membrandefekten und probeninterne Proteolyse (7).

Vor der Messung erfolgten zwei mindestens 15-minütige Waschschrte in BDM-haltiger RS. Diese erfolgten zur Reduktion der Triton-Konzentration bei Raumtemperatur auf Eis auf einem Schütteltisch gelagert bei circa 50 rpm.

Anschließend wurden die Muskelfasern unter einer Binokularlupe auf einem eisgekühlten Deckglas für die Messung präpariert. Dazu erfolgte eine Abtragung vorhandenen Fettgewebes und eventueller Faszienreste mit einer Pinzette sowie ein scharfer Ausschnitt von Sehnenmaterial im Muskel mittels Skalpell. Die eigentliche Faserpräparation erfolgte dann wieder stumpf mit der Pinzette. Es wurde ein Faserdurchmesser von circa 0,05 bis 0,5 mm angestrebt und nicht über die Faserlänge intakte Bestandteile abgetragen. Bis zur Messung der Einzelfaser wurden diese erneut in BDM-haltiger RS gelagert.

Für die Kraftmessung wurde jeweils eine einzelne Faser in die biomechanische Messstation eingespannt und mit Klemmen, von denen eine über ein Piezo-Element als Kraftmesser fungierte, befestigt (siehe Abb. 2.7.1). In kleinen Kunststoffschälchen, mit einem Fassungsvermögen von 900µl (Mikroliter) wurden die benötigten Umgebungslösungen für die Messungen vorgelegt. Durch ein Absenken der Einspannungsvorrichtung wurde die Faser vor der Messung in das entsprechende Medium bewegt. Zwischen den Messungen konnten die Lösungen über eine Revolverlagerung ausgetauscht werden. Vor der ersten Messung wurden die bis dahin auf Eis gelagerten Lösungen durch eine circa zehnminütige Wartezeit auf Raumtemperatur gebracht. Alle 2 bis 3 Stunden erfolgte ein

Austausch der Lösungen mit erneuter anschließender Wartezeit. Die bis zum Austausch gemessenen Fasern wurden in derselben Lösung inkubiert.

Das Kraftsignal wurde mit einem Verstärker registriert und mit einem Computer über die Kraftmessungs-Software aufgezeichnet. Die so erhobenen Werte wurden manuell dokumentiert. Für alle Proben wurden jeweils drei oder vier Fasern eines Muskels gemessen und für die weitere Analyse das arithmetische Mittel dieser Messwerte gebildet.

2.7.2 Passive Messungen

Für die passiven Kraftmessungen wurden die Fasern in der Messstation in BDM-haltiger Relaxationslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier diente das BDM der Prävention aktiver Muskelkontraktionen (430), wobei bereits gezeigt werden konnte, dass dies die passive Kraft einer Faser nicht beeinflusst (432). Unter Kontrolle mithilfe des Kraftmessers erfolgte eine Korrektur der Fasereinspannung auf genau die Länge, an der eine weitere Dehnung der Faser zur ersten deutlichen Kraftantwort führte.

Die Länge der auf diese Weise eingespannten Faser wurde mithilfe einer Skala im Okular einer Binokularlupe geschätzt. Die so ermittelte Länge wurde dem anschließenden Messprotokoll zugrunde gelegt.

Mithilfe der Kraftmessungs-Software wurde die Faser etappenweise um zunächst 10%, dann 20%, dann 30% dann 40% und zuletzt 50% ihrer Ausgangslänge gedehnt. Nach jedem Schritt wurde die erreichte Länge für 20 Sekunden gehalten und das Plateau der an der Faser anliegenden Kraft am Ende dieser Zeit gemessen. Die erste dieser Dehnungsreihen wurde lediglich als Vordehnung durchgeführt, erst die anschließenden zweiten bis vierten Reihenmessungen wurden aufgezeichnet. Von diesen ausgehend wurde das arithmetische Mittel der Kraft zu jeder Dehnungsstufe für jede Faser einzeln ermittelt.

2.7.3 Aktive Messungen

Die aktiven Messungen erfolgten mithilfe einer Verdünnungsreihe bestehend aus unterschiedlichen Mischverhältnissen von Aktivierungslösung (AS) und RS. Zunächst wurde die Faser für mindestens zehn Minuten in BDM-freier RS gewaschen. Anschließend erfolgte eine optisch-kontrollierte Vordehnung der Faser um circa 20% ihrer Länge.

Für eine initiale maximale Aktivierung wurde die Faser dann in reine AS mit einer Kalziumionenkonzentration ($c(\text{Ca}^{2+})$) von 3mmol/L überführt. Als die Faser ihre maximale aktive Kraft erreicht hatte und sich ein Plateau einstellte oder aber die Kraft begann abzufallen, wurde sie in sechzigprozentige AS (verdünnt mit RS) überführt. In dieser Lösung lag die $c(\text{Ca}^{2+})$ bei 1,8mmol/L. Als sich dort erneut eine konstante Kraft eingestellt hatte, wurde sie in siebzugprozentige AS ($c(\text{Ca}^{2+})=2,1$ mmol/L)

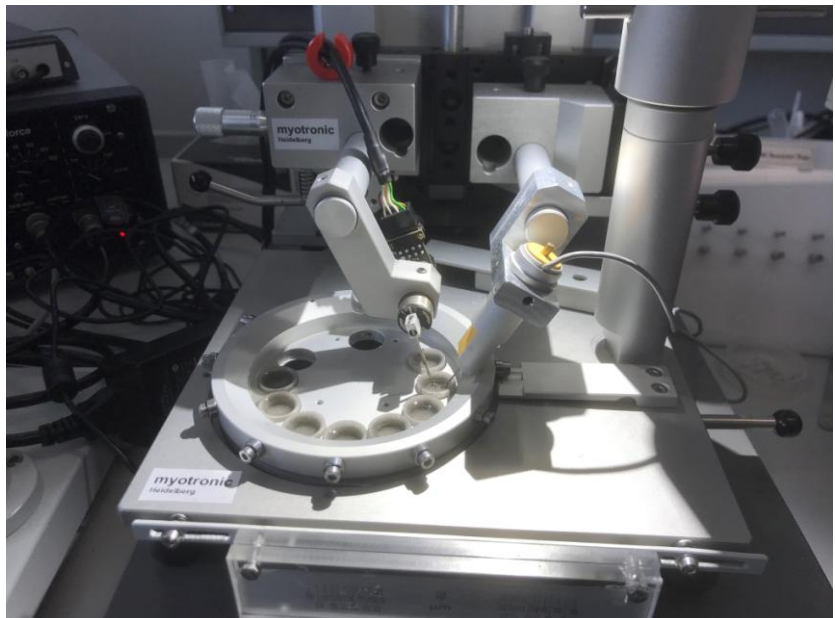


Abb. 2.7.1 Biomechanische Messstation Myotronic. Sichtbar sind die beiden Arme der Messstation, zwischen denen einzelne Muskelfaserbündel eingespannt werden können. Daraufhin kann durch den modulierbaren Arm (rechts) eine protokollbasierte Einspannung oder Dehnung der Faser erfolgen, während der Kraftmesser (links) die dazugehörige Kraft über die Faser misst. Im Revolverlager (runde Platte unten) können unterschiedlich zusammengesetzte Medien vorgelegt und schnell gewechselt werden

überführt. Dann wurde die Faser jeweils nach Erreichen des Plateaus als Nächstes in achtzigprozentige ($c(\text{Ca}^{2+})=2,4\text{mmol/L}$), dann in neunzigprozentige ($c(\text{Ca}^{2+})=2,7\text{mmol/L}$) und schließlich erneut in reine AS überführt.

Als sich dann hier ein Plateau einstellte, wurde die Faser erneut um 20% vorgedehnt, also auf 40% Dehnung im Vergleich zur Ausgangslänge und erneut die Einstellung eines Plateaus abgewartet. Dann wurde die Faser in reiner RS bis zum Erreichen eines Plateaus relaxiert, um weitere 20% auf eine Dehnung von 60% über der Ausgangslänge vorgedehnt und erneut in reine AS überführt. Das sich einstellende Plateau wurde dokumentiert. Zuletzt wurde der Durchmesser der Faser mithilfe der Skala im Okular der Binokularlupe nach Drehung um 90° ermittelt und mit der Skala eines Messdeckglases abgeglichen.

2.8 Protein-Biochemie

2.8.1 Solubilisierung

Zur proteomischen Analyse von Muskelgewebe wurde zunächst des Zellverbands der präparierten Gewebeproben zerstört, um die Proteine in Lösung zu bringen. Eine geringe Menge (circa 50mg) wurden von einer Muskelprobe mittels Skalpell abgetragen und auf ein auf Eis gelagertes und mit Trockeneis vorgekühltes Uhrglas überführt. Dort wurde zunächst Titin-Probenpuffers (circa 150 μl) hinzugegeben. Dieser Puffer wurde bei -20°C gelagert, zur Verwendung auf Raumtemperatur aufgewärmt, vor jeder Benutzung frisch mit 5 Volumenprozent Dithiothreitol (DTT) versetzt und mittels Vortexer vermischt. Anschließend wurde die Probe im durch die Kälte viskösen Puffer auf dem Uhrglas mittels beidhändiger Präparation mit Skalpell zerkleinert, bis unter optischer Kontrolle keine Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Daraufhin wurden die Proben in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine mindestens halbstündige Lagerung aller Proben auf Eis. Daraufhin wurden die Proben für drei Minuten auf 98°C erhitzt. Als danach die Proben wieder annähernd Raumtemperatur erreicht hatten, erfolgte eine dreiminütige Abzentrifugation bei 13 000 rpm sowie eine Überführung des Überstandes in ein neues Versuchsgefäß, um eventuelle größere Bestandteile als *Debris* aus der Probe zu eliminieren.

Die so generierten Proben wurden entweder bei Verwendung am gleichen oder darauffolgenden Tag bei 4°C oder bei einer darüberhinausgehenden Zeit bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Ab dem zweiten Tag erfolgte vor der Verwendung eine Hinzugabe von 1 μl frischem DDT, aufgrund der empirischen Beobachtung in der Arbeitsgruppe, dass dies die Bandenschärfe verbessert.

2.8.2 Bradford-Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde nach der klassischen Bradford-Proteinbestimmung (433) photometrisch durchgeführt. Für die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte zunächst eine Vorverdünnung im Verhältnis 1:5 mit Millipore Wasser, sodass 2 μl Probe mit 8ml Wasser auf 10 μl aufgefüllt wurden. Dies diente der Verringerung der Konzentration die Methode störender Bestandteile des Titin-Probenpuffers. Das photoaktive Bradford-Reagenz wurde in ein 50mL-Tube überführt und mittels Aluminiumfolien-Ummantellung und Lagerung in einer geschlossenen Schublade lichtgeschützt auf Raumtemperatur gebracht. Daraufhin wurden jeweils 800 μl Millipore-Wasser mit 200 μl Reagenz in ein 1,5ml-Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und eine Menge von 2 μl vorverdünnter Probe in den Deckel pipetiert, sodass die Probe zunächst noch nicht in Kontakt mit dem Reagenz kam. Dieses Vorgehen dient der Vereinheitlichung der Reaktionszeit. Pro Probe wurden zwei derartige Versuchsansätze vorbereitet und anschließend mit der durchschnittlichen Absorption gerechnet.

Zur Normierung der Messwerte wurde gleichzeitig eine Negativkontrolle bestehend aus 1200 μl Wasser und 300 μl Bradford-Reagenz vorbereitet. Diese wurde in eine Küvette überführt und zur Kalibrierung des Photometers genutzt. Das größere Volumen im Vergleich zum Probenansatz bei dieser Negativkontrolle, stellte sich in der Handhabung des Photometers als nützlich heraus. Da jedoch das durchleuchtete Volumen im Photometer konstant ist und die Konzentrationen identisch sind, ist hierdurch keine eingeschränkte Vergleichbarkeit zu erwarten.

Die vorbereiteten Reaktionsgefäße wurden dann geschlossen, vierfach invertiert und anschließend für circa fünf Sekunden auf einem Vortexer vermischt. Daraufhin erfolgte die Überführung in eine Küvette und die Absorbtionsmessung bei 595nm Wellenlänge mit dem Photometer. Die ermittelten Extinktionen wurden notiert und anschließend mit einer am selben Photometer mit derselben Bradford-Reagenz-Charge angefertigten Standardkurve abgeglichen.

Hierfür erfolgte die Messung einer Verdünnungsreihe basierend auf einer Lösung mit 2mg/ml BSA gelöst in Wasser. Von dieser Lösung wurden 3, 5, 7, 9, 10, 12, 15 und 17µl jeweils mit Wasser auf 20µl aufgefüllt sowie in einem Ansatz auch 20µl unverdünnte Probe vorgelegt und eine Negativkontrolle bestehend aus 20µl Wasser vorbereitet. Die photometrischen Messungen der Proben im Reagenz erfolgten hierbei wie oben beschrieben. Aus den gemessenen Extinktionen wurde in Auftragung mit der bekannten Proteinkonzentration in mg/ml eine Ausgleichsgerade erstellt, die die Punkte möglichst in einer linearen Funktion zueinander in Beziehung setzte. Für das in dieser Arbeit verwendete Bradford-Reagenz lautet die Funktion der Ausgleichsgeraden: $f(x)=0,0787x-0,0033$. Die in diesem Abschnitt beschriebene Normierung erfolgte durch Frau Sabine Bongardt, die medizinisch technische Assistentin der Arbeitsgruppe.

Basierend auf der oben beschriebenen Funktion wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt. Aufgrund der 1:5-Verdünnung der Proben und des Einsatzes von 2µl liegt die Konzentration der eigentlichen Probe um den Faktor 2,5 höher als das entsprechende Ergebnis nach Berechnung anhand der Funktion.

2.8.3 SDS-Page und Western Blot

Das SDS-Page erfolgte nach eigenem Protokoll mit Anlehnung an das Lämmli-System (434). Hierbei werden die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine durch das SDS aufgelöst und die Proteine denaturiert. Dies wird durch eine chemische Reduktion der Proteine durch das den Proben vorher hinzugegebene DDT begünstigt (435). Anschließend ist dann über das Anlegen einer Spannung aufgrund der negativen Netto-Gesamtladung der Proteine im verwendeten Puffersystem eine Elektrophorese möglich. Da diese durch ein Acrylamid-Polymergel erfolgt, das mit großen Proteinen stärker wechselwirkt als mit kleineren und diese so verlangsamt, ermöglicht dies eine Auftrennung der Proteine in einer Probe nach deren Größe. Im Unterschied zum ursprünglichen Protokoll wurde lediglich dem Laufpuffer Glycin hinzugefügt, während Trenngel- und Sammelgelpuffer ohne Glycin verwendet wurden. Durchgeführt wurde das Protokoll mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System.

Es wurden zunächst die SDS-Gele vorbereitet. Dies erfolgte direkt in den Gelformen des Trans-Blot® Turbo™ Transfer System in den dafür vorgesehenen Ständern. Für die Standardgele wurde zunächst ein Trenngel gegossen und anschließend darüber ein Sammelgel aufgebracht. Das verwendete Trenngel mit einem Gehalt von insgesamt 7,5% Acrylamid wurde wie folgt zusammengesetzt: 7,5%: 25% Acrylamid (37,5:1), 50% vollentsalztes Wasser, 25% Trenngelpuffer, 0,05% Temed, 0,5% APS-Lösung. Pro Gel wurden in diesem Verhältnis 7,5mL angesetzt und anschließend in Gelform gegeben. Nach oben hin wurde 2 bis 3cm Platz für das Sammelgel gelassen und das Gel mit einem Film aus Isopropanol abgeschlossen, um Blasenbildung zu vermeiden und eine glatte Gelgrenze zu gewährleisten. Nachdem das Trenngel vollständig erstarrt war, wurde das Isopropanol ausgeschüttet, eventuelle Reste mit einem Whatman®-Paper aufgenommen und das Sammelgel aufgebracht. Dieses setzte sich zusammen aus 13,33% Acrylamid (37,5:1), 73% vollentsalztes Wasser, 12,5% Sammelgelpuffer, 0,3% Temed und 1% APS-Lösung. Die Gelform wurde bis zum oberen Rand gefüllt und direkt mit dem Taschenkamm versehen. Bis auch das Sammelgel erstarrt war, wurden die Ständer bei RT belassen, dann feucht eingeschlagen und bei 4 °C über Nacht gelagert. Die Verwendung erfolgte am Folgetag.

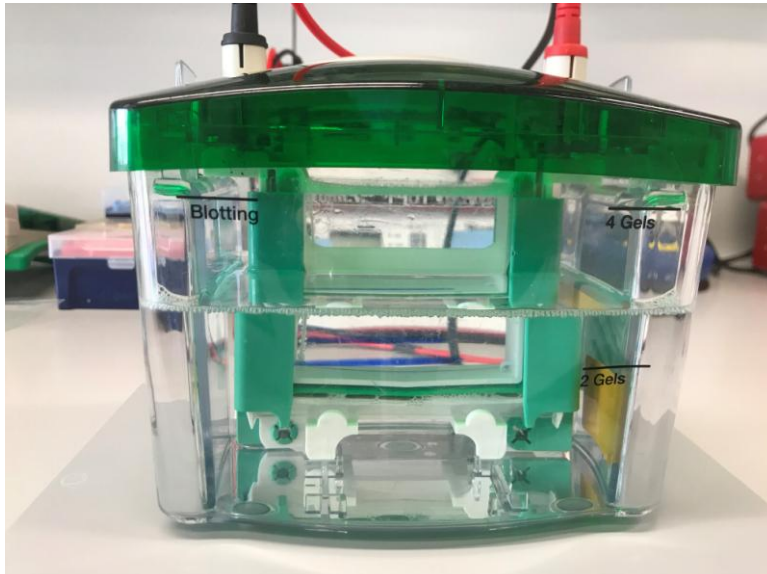


Abb. 2.8.1 Elektrophoresekammer des Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. Innerhalb des flüssigen Puffers werden die Acrylamidgele in eine Einspannungsvorrichtung eingespannt und einem definierten elektrischen Strom ausgesetzt, der eine ladungs- und größenabhängige Auftrennung der Proteine im Gel ermöglicht. Die Ladungskontrolle (blaue Linie) dient als Referenz für den Fortschritt der Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden die Gele aus den Ständern in die Elektrophoresekammer überführt und in der Halterung eingespannt (siehe Abb. 2.8.1). Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Taschenkämme wurden vorsichtig entfernt. Anschließend wurden der Bereich oberhalb der Taschen mit einem Rasiermesser abgefahren und die einzelnen Taschen mithilfe einer Spritze mit Küvette mit Laufpuffer durchspült, um so eventuelle Gelreste aus den Taschen zu entfernen. In die erste Tasche wurden 8µl Bandenmarker gegeben. In die anderen Taschen wurden jeweils 12,5µg Protein aus den Proben gegeben. Die 25 untersuchten Proben wurden dabei wie folgt auf drei Gele mit jeweils 10 Taschen aufgeteilt (siehe Tabelle 7):

| Gel Nummer | Tasche 1 | Tasche 2 | Tasche 3 | Tasche 4 | Tasche 5 | Tasche 6 | Tasche 7 | Tasche 8 | Tasche 9 | Tasche 10 |
|------------|--------------|------------|-------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| 1 | Bandenmarker | dB+ sham 1 | dBdB sham 1 | dB+ IR 1 | dBdB IR 1 | dB+ IR 2 | dBdB IR 2 | dB+ IR 3 | dBdB IR 3 | |
| 2 | Bandenmarker | dB+ sham 2 | dBdB sham 2 | dB+ IR 4 | dBdB IR 4 | dB+ IR 5 | dBdB IR 5 | dB+ IR 6 | dBdB IR 6 | |
| 3 | Bandenmarker | dB+ sham 3 | dBdB sham 3 | dB+ IR 7 | dBdB IR 7 | dB+ IR 8 | dBdB IR 8 | dB+ IR 9 | dBdB IR 9 | dB+ IR 10 |

Tabelle 7 Beladungsmuster bei den Western-Blots. Die Gelnummer gibt getrennt geblottete Gele an, die anderen Spalten die Taschen innerhalb eines Gels. Die restlichen Zellen geben die eingesetzten skelettmuskulären Proben an. Dabei dient der Bandenmarker als Referenz. dB+ bezieht sich auf Ursprungstiere mit partieller Leptin-Rezeptor-Defizienz dBdB auf Ursprungstiere mit kompletter Leptin-Rezeptor-Defizienz. Die Nummerierung gibt die fortlaufende Nummer des Ursprungstiere, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden, an.

Wenn die letzte Tasche des Gels frei blieb und ausreichend Probe zur Verfügung stand wurde hier ein zweites Mal die dB+ sham Probe des jeweiligen Gels als Kontrolle aufgetragen. Mit dieser Beladung wurde die Elektrophorese in zwei Phasen durchgeführt. In einer ersten Einlaufphase wurden mit einem Strom von 7,5 mA pro Gel die Proben circa eine Stunde lang elektrophoriert, bis sich eine scharf

eingestellte Lauffront zeigte. Dann wurde der Strom auf 12,5 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Lauffront gerade den Unterrand des Gels verlassen hatte.

Die Übertragung auf eine Membran erfolgte mittels Trans-Blot® Turbo™ Transfer System in Anlehnung an Towbin et al. und Burnette (436, 437). Hierzu wurden vier *Whatman®-Paper* mit Anodenpuffer getränkt und übereinander glatt auf der Kammerunterseite ausgelegt. Darauf wurde eine proteinbindende Membran, die zuvor in Ethanol aktiviert wurde, gelegt. Das Gel wurde aus der Gelform genommen und vorsichtig auf die Membran überführt. Die Orientierung bei Draufsicht wurde dabei beibehalten. Nach oben abgeschlossen wurde der Stapel mit vier in Kathodenpuffer getränkten *Whatman®-Papieren*. Der Stapel wurde mit einer Rolle glattgestrichen und die Kammer verschlossen. Die Übertragung auf die Membran erfolgte bei 1,5A für 12 Minuten. Um Salzreste des hierbei verwendeten Puffers von der Membran zu entfernen, wurde sie anschließend einmal kurz in vollentsalztes Wasser getaucht.

2.8.4 Coomassie-Membranfärbung

Die im Western-Blot generierten Membranen wurden in einer Kunststoffschale mit Coomassie *Brilliant Blue R-250*-haltiger PVDF-Färbelösung für circa 10-20 Sekunden inkubiert und anschließend in PVDF-Entfärbelösung für 5-10 Minuten gewaschen. Dann wurde die Entfärbelösung verworfen und mit Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween20 (TBST) einmal kurz und einmal für circa 10 Minuten gewaschen. Die verwendete Färbelösung wurde dabei für unterschiedliche Membranen mehrfach wiederverwendet, bis sie farblich ausgebleicht war.

2.8.5 Membran-Immunfärbung

Zur Darstellung spezifischer Zielproteine wurden Antikörper verwendet in Anlehnung an Dunn(438). Für die Antikörpermarkierung von membrangebundenen Zielproteinen erfolgte nach einer kurzen Waschung mit TBST eine Blockierung der Membran. Hierzu wurde die Membran auf einem Schütteltisch in einer Schale bei circa 70 rpm oder alternativ in einem 50ml-Falcon auf einer Wendebank für ein bis eineinhalb Stunden in TBST mit 2% BSA inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran mit einem primären zielstrukturbindenden Antikörper gelöst ebenfalls in 1xTBST mit 2% BSA. Diese Inkubation erfolgte über Nacht und dauerte damit zwischen 13 und 20 Stunden. Anschließend wurde die Membran dreifach kurz mit TBST ab gespült und dann für 30 Minuten in TBST auf einer Wendebank inkubiert.

Daraufhin erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper. Dieser band spezifisch Immunglobuline des Organismus, aus dem der primäre Antikörper stammte und war an eine *Horse Raddish Peroxidase* (HRP) gekoppelt. Der Antikörper wurde dabei ebenfalls in TBST mit 2% BSA gelöst. Die Membran wurde für eineinhalb bis drei Stunden auf der Wendebank in der Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreifach mit TBST ab gespült und anschließend für 30 Minuten in TBST inkubiert.

2.8.6 Imaging

Das dunkel gelagerte HRP-Reagenz wurde zum *Imaging* täglich frisch im Verhältnis 1:1 aus Lösung A und Lösung B angesetzt. Es erfolgte eine vollständige Benetzung der Membran und Überführung in einen Folien-Umschlag.

In diesem wurde es in den *Imager* gelegt. Die Erstellung der Bilder erfolgte mit dem *Imaging*-Programm. Bei der Belichtungszeit erfolgte eine Orientierung an der software-internen Sättigungskontrolle, bei der eine möglichst hohe Sättigung ohne Erreichen einer kritisch zu hohen und damit weniger aussagekräftigen Sättigung angestrebt wurde.

Die so erstellten Bilder dienten als Grundlage der Auswertung.

2.8.7 Stripping

Nachdem zunächst die Antikörper gegen die phosphorylierten Zielstrukturen auf den Membranen inkubiert und anschließend eingelesen wurden, wurden diese für die Antikörperfärbung gegen das

Gesamtprotein von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran für circa 20 Minuten in Stripping-Puffer auf einer Rollbank inkubiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt und es erfolgte ein Waschschriff, bei dem die Membran dreifach mit TBST überspült und anschließend für 30 Minuten in TBST auf einer Rollbank inkubiert wurde. Dieser Waschschriff wurde anschließend ein zweites mal wiederholt. Daraufhin erfolgte eine erneute Blockierung der Membran in TBST mit 2% BSA für ein bis zwei Stunden und die nächste Antikörperfärbung konnte wie oben beschrieben durchgeführt werden.

2.8.8 Gel Direktfärbung

Bei der Geldirektfärbung erfolgte eine direkte Coomassie Färbung des Protein-Gels. Dieses Verfahren wurde gewählt, um Titin gemeinsam mit seiner Degradationsbande mit Myosin, einer vergleichbaren Ladekontrolle, darzustellen.

Das Protein-Gel hatte insgesamt einen Acrylamid-(29:1)-Anteil von 2,6%. Es wurden 8,65% Acrylamid (29:1), 31,67% vollentsalztes Wasser, 25% Trenngelpuffer, 0,5% SDS-Lösung (20% SDS in vollentsalztem Wasser) und 0,0575% Temed gemischt und anschließend in einem Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Die Agarose-Lösung wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis sie vollständig flüssig war und keine Schlieren mehr aufwies, woraufhin sie ebenfalls in das Wasserbad gestellt wurde. Dann wurden der Gel-Lösung 0,75% APS sowie zügig 33,33% Agaroselösung hinzugefügt. Der Ansatz wurde im Wasserbad durch Auf-und-ab-Pipettieren vermischt und direkt in die Gel-Formen überführt. Anschließend wurde umgehend der Taschenkamm eingeführt. Nachdem das Gel bei RT erstarrt war, wurde es feucht eingeschlagen und bei 4 °C über Nacht gelagert. Die Verwendung erfolgte am Folgetag.

Das Protein-Gel wurde analog zum oben beschriebenen Verfahren in einer Elektrophoresekammer elektrophoriert. Für jede Probe wurden jeweils 15µg eingesetzt. Es wurde kein Bandenmarker verwendet. Daraus ergab sich die Beladung (siehe Tabelle 8):

| Gel Nummer | Tasche 1 | Tasche 2 | Tasche 3 | Tasche 4 | Tasche 5 | Tasche 6 | Tasche 7 | Tasche 8 | Tasche 9 | Tasche 10 |
|------------|------------|-------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | dB+ sham 1 | dBdB sham 1 | dB+ IR 1 | dBdB IR 1 | dB+ IR 2 | dBdB IR 2 | dB+ IR 3 | dBdB IR 3 | | |
| 2 | dB+ sham 2 | dBdB sham 2 | dB+ IR 4 | dBdB IR 4 | dB+ IR 5 | dBdB IR 5 | dB+ IR 6 | dBdB IR 6 | | |
| 3 | dB+ sham 3 | dBdB sham 3 | dB+ IR 7 | dBdB IR 7 | dB+ IR 8 | dBdB IR 8 | dB+ IR 9 | dBdB IR 9 | dB+ IR 10 | |

Tabelle 8 Beladungsmuster bei der Protein-Gel-Direktfärbung. Die Gelnummer gibt getrennt geblottete Gele an, die anderen Spalten die Taschen innerhalb eines Gels. Die restlichen Zellen geben die eingesetzten skelettmuskulären Proben an. dB+ bezieht sich auf Ursprungstiere mit partieller Leptin-Rezeptor- Defizienz. dBdB auf Ursprungstiere mit kompletter Leptin-Rezeptor- Defizienz. Die Nummerierung gibt die fortlaufende Nummer der Ursprungstiere, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden, an

Wenn die letzte Tasche des Gels frei blieb und ausreichend Probe zur Verfügung stand, wurde hier ein zweites Mal die dB+ sham Probe des jeweiligen Gels als Kontrolle aufgetragen. Die Spannung lag für eine Stunde bei 2mA pro Gel und anschließend bei 8mA pro Gel. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als die Lauffront gerade aus der Unterkante des Gels ausgelaufen war. Das Gel wurde aus der Gelform in eine Kunststoffschale überführt. Hier erfolgte dann eine einstündige Inkubation mit *Imperial™ Protein Stain* auf einem Schütteltisch bei circa 50 rpm. Anschließend wurde der *Stain* abgeschüttet, das Gel mit vollentsalztem Wasser einmal abgespült und anschließend über Nacht in vollentsalztem Wasser auf einem Schütteltisch bei circa 50rpm inkubiert.

Ein Einlesen des Gels erfolgte am folgenden Tag im *Imager* mit dem *Imaging*-Programm unter der Einstellung „Coomassie“ und einer Belichtungszeit von 80ms.

2.8.9 Western-Blot mit Titin als Target-Protein

Der *Western-Blot* erfolgte mit dem *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*. Hierbei fand das Agarose-Verstärkte SDS-Gel zur Darstellung besonders großer Proteine Anwendung nach der Entwicklung von Tatsumi und Hattori(439). Für das Titinprotein wurde diese Methode durch Linke et al. zum ersten Mal angewendet (5).

Das verwendete Protein-Gel hatte insgesamt einen Acrylamid (29:1)- Anteil von 2,1%. Es wurden 7% Acrylamid (29:1), 33,33% vollentsalztes Wasser, 25% Trenngelpuffer, 0,5% SDS-Lösung (20% SDS in vollentsalztem Wasser) und 0,0575% Temed gemischt und anschließend in einem Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Die Agarose-Lösung wurde in der Mikrowelle erhitzt bis sie vollständig flüssig war, woraufhin sie ebenfalls in das Wasserbad gestellt wurde. Dann wurde der Gel-Lösung 0,75% APS sowie zügig 33,33% Agaroselösung hinzugefügt. Der Ansatz wurde im Wasserbad durch Auf-und-ab-Pipettieren vermischt und direkt in die Gel-Formen überführt. Anschließend wurde umgehend der Taschenkamm eingeführt. Nachdem das Gel bei RT erstarrt war, wurde es feucht eingeschlagen und bei 4°C über Nacht gelagert. Die Verwendung erfolgte am Folgetag.

Die Elektrophorese sowie die Gelbeladung entsprach der, die für die Geldirektfärbung beschrieben wurde.

Die Übertragung auf eine Membran erfolgte mittels *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*. Hierzu wurden vier *Whatman®-Paper* mit Anodenpuffer getränkt und übereinander glatt auf der Kammerunterseite ausgelgt. Darauf wurde eine proteinbindende Membran, die zuvor in Ethanol aktiviert wurde, gelegt. Das Gel wurde mit einem Spatel in der Gelform mobilisiert und vorsichtig auf die Membran gestürzt. Die Orientierung bei Draufsicht wurde dabei beibehalten. Nach oben abgeschlossen wurde der Stapel mit vier in Kathodenpuffer getränkten *Whatman®-Papern*. Der Stapel wurde mit einer Rolle glattgestrichen und die Kammer verschlossen. Die Übertragung auf die Membran erfolgte bei 1A für 40 Minuten. Um Salzreste der hierbei verwendeten Puffer von der Membran zu entfernen, wurde sie anschließend einmal kurz in vollentsalztes Wasser getaucht.

Ab diesem Schritt entsprach das weitere Vorgehen mit den Membranen dem oben beschriebenen Verfahren.

2.9 Auswertung

2.9.1 Biomechanik

Zunächst wurden die Messwerte aus der Fasermessung auf den Querschnitt normiert. Dafür wurde für jede Faser eine Kreisfläche bestimmt, die denselben Durchmesser aufwies wie die Faser. Diese Kreisfläche diente als Annäherung des Querschnitts. Die absoluten Messwerte der Kraft in Millinewton (mN) aus den aktiven sowie passiven Messungen wurden durch den Querschnitt in Quadratmillimetern (mm²) geteilt. Zusätzlich wurden auch die maximalen aktiven Kräfte abhängig von der bestehenden Faservordehnung in dieser Weise auf den Faserquerschnitt normiert. Genauso wurde mit den initialen, also vor der Faserinkubation in der Verdünnungsreihe der Aktivierungslösung, und terminalen, also nach der Faserinkubation in der Verdünnungsreihe der Aktivierungslösung, Kraft verfahren.

Für die Bestimmung der Kalziumsensitivität wurde die relative Kraftänderung auf die Differenz zwischen Ausgangswert und Maximum normiert. Bei einer Kalziumionenkonzentration von 1,8mM war noch bei keiner der gemessenen Fasern eine aktive Kraftgenerierung zu beobachten, jedoch war die absolute gemessene Kraft regelhaft größer als null, da die Faser bereits um 20% ihrer Länge vorgedehnt wurde. Der hier gemessene Kraftwert diente als Ausgangswert. Als Maximum wurde die aktive Kraft bei einer Kalziumionenkonzentration von 3mM betrachtet.

Für die Berechnung eines Einzelwertes in Prozent ergab sich daher die Formel:

$$F_{aktiv,[Ca^{2+}]=x}(x) = \frac{F_{gesamt,[Ca^{2+}]=x} - F_{gesamt,[Ca^{2+}]min}}{F_{gesamt,[Ca^{2+}]max} - F_{gesamt,[Ca^{2+}]min}} * 100[\%]$$

Die so für jede Faser ermittelten Einzelwerte wurden für jede Gewebeprobe über das arithmetische Mittel verrechnet. Dabei flossen bei jedem Gewebe zwischen drei und vier Fasern in das Mittel ein.

Für die statistische Analyse der Daten wurden diese nach den Gruppierungskriterien des Genotyps, also dB+ gegen dBdB, sowie ihrer Behandlung also *sham* gegen *IR* aufgetragen. Angewendet wurde dabei ein *Two-Way-Anova* mit *Full-Fit-Model* in dem zwei *Sidak's multiple comparison Tests* separat durchgeführt wurden. Der Erste verglich die beiden Genotypen, der Zweite verglich die beiden Behandlungen. Zugrunde gelegt wurden die Dehnungsreihe bei der passiven Kraftmessung sowie die Verdünnungsreihe bei der aktiven Kraftmessung und der Bestimmung der Kalziumsensitivität. Bei der maximalen aktiven Kraft bei variierter Vordehnung wurden die Werte für 20%, 40% und 60% Vordehnung auch im Sinne einer Dehnungsreihe gemeinsam analysiert. Bei dem Vergleich der initialen und terminalen Maxima wurde der *Two-Way-Anova* auf den Unterschied dieser beiden Werte innerhalb einer Gruppe durchgeführt. Intermuskulär wurden ebenfalls mittels *Two-Way-Anova* die Unterschiede innerhalb einer Gruppe mit identischem Genotyp bei gleicher Behandlung zwischen den beiden Muskeln betrachtet.

2.9.2 Biochemie

Die Auswertung der eingeleseenen Bilder erfolgte mit *Labview*. Dabei wurde für die Antikörperfärbungen sowie auch für die Geldirektfärbungen gleichermaßen verfahren. Die zu analysierende Bande wurde mit einer rechteckigen Auswahl markiert. Dabei wurde möglichst die gesamte Bande markiert, ohne dass es zu Überschneidungen der Auswahl mit anderen Banden kam. Die Messwerte wurden als Excel-Tabelle exportiert. Verwendung fand dabei jeweils der Messwert des *Adjusted volumes*, das eine lokale Hintergrundkorrektur durch die Software durchläuft.

Als Nächstes erfolgten die Bestimmung der Verhältnisse und die Normierung. Dafür wurden jeweils die Phosphoantikörperfärbungen durch das Signal der Dephosphoantikörperfärbungen aus dem gleichen Blot geteilt. Die Dephosphoantikörperfärbungen von PKC und AMPK wurden durch das GAPDH-Signal der Probe geteilt. Bei der Geldirektfärbung wurden die obere Titinbande (T1) und die untere Titinbande (T2 oder Degradationsbande) jeweils durch die entsprechende Myosinbande geteilt, sowie die T2-Bande auch durch die T1-Bande. Zur Normierung wurden die so bestimmten Verhältnisse durch das entsprechende Verhältnis der im selben *Blot* aufgetragenen Kontrolle (*sham* dB+) geteilt und mit 100 Prozent multipliziert. Wurde eine Probe oder ein *Blot* mehrfach bearbeitet, so fanden die arithmetischen Mittel der jeweiligen Verhältnisse der Signalstärke Anwendung und wurden jeweils vor der Normierung verrechnet.

Zur Teilkorrektur der Varianzen zwischen den einzelnen *Blots* bei analoger Taschenbelastung erfolgte eine Faktorkorrektur in Anlehnung an Ruijter et al. (440) Das Verfahren dient der Elimination etwaiger multiplikativer Störfaktoren. Dazu wurde das geometrische Mittel aller normierten Werte in einer *Blot*-Serie ermittelt sowie das geometrische Mittel jedes einzelnen *Blots* innerhalb der Serie. Aus der Division des geometrischen Mittels über alle Werte durch das geometrische Mittel eines einzelnen *Blots* ergab sich ein Korrekturfaktor, der mit den normierten Verhältniswerten innerhalb des jeweiligen *Blotes* multipliziert wurde. So wurde mit allen Werten verfahren. Konnten die angefertigten Replikate der *Blots* vollständig verwendet werden, ist die Anwendung der Faktorkorrektur auf das arithmetische Mittel dieser unstrittig, da sich auch in diesem multiplikative Störfaktoren s_1 und s_2 vollständig abbilden und so dem Korrekturverfahren als s_3 zugeführt werden konnten, da gilt:

$$W = \frac{a * s_1 + a * s_2}{2} = a * \left(\frac{1}{2} s_1 + \frac{1}{2} s_2 \right) = a * s_3$$

Wenn nur einzelne Proben innerhalb eines Replikats verwendet werden konnten, verhinderte dies eine Isolation des Störfaktors, da bei fehlender Überschneidung der Probenzusammensetzung, das beschriebene Verfahren keine stellvertretenden Korrekturfaktoren bereitstellen kann. Daher wurden

diese Werte ausschließlich normiert und in das arithmetische Mittel einbezogen, um den relativen Fehler zu reduzieren und trotzdem vom Informationsgehalt solcher Daten zu profitieren.

In der Analyse mit Prism erfolgte zunächst eine Bereinigung von *Outliern*. Es wurde die Programminterne *Outlier*-Analyse (ROUT (Q = 1%)) durchgeführt. Identifizierte *Outlier* wurden anschließend aus der Analyse sowie der Korrekturfaktorberechnung entfernt, sodass sich neue korrigierte Werte ergaben.

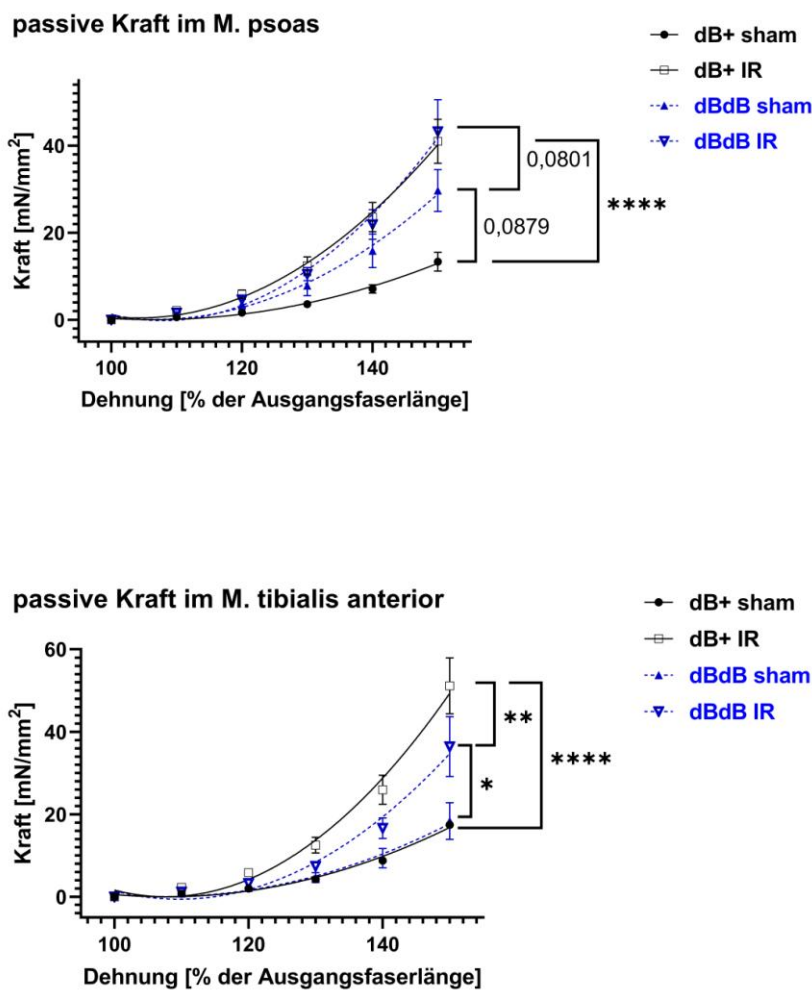
Für die statistische Analyse der Daten wurden diese analog zum Vorgehen bei den Daten aus der Biomechanik nach den Gruppierungskriterien des Genotyps, also dB+ gegen dBdB, sowie ihrer Behandlung also *sham* gegen *IR* aufgetragen. Angewendet wurde dabei *ein Two-Way-Anova* mit *Full-Fit-Modell* in dem zwei *Sidak's multiple comparison Tests* separat durchgeführt wurden. Der Erste verglich die beiden Genotypen, der Zweite verglich die beiden Behandlungen. Für die intermuskuläre Analyse wurden die Daten zusammengetragen und nach Muskeln gruppiert. Innerhalb einer Gruppe mit identischem Genotyp und identischer Behandlung wurden die relativen Unterschiede untersucht. Zur Darstellung der unterschiedlichen Ausgangswerte und das Verhältnis der absoluten Werte zwischen den Muskeln erfolgte eine erneute Normierung auf den jeweiligen arithmetischen Mittelwert in der Gruppe Psoas db+ *sham*. Darauf bezogen wurde wie oben beschrieben ebenfalls eine Faktorkorrektur durchgeführt sowie eine erneute *Outlier*-Analyse vorgenommen. Diese Daten wurden gegeneinander aufgetragen und ebenfalls mittels *Two-Way-Anova* mit *Full-Fit-Modell* in einem *Sidak's multiple comparison* Test für die jeweilige Gruppe zwischen den Muskel verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Biomechanik

3.1.1 passive Kraft

Zunächst wurde die passive Kraftentwicklung bei stufenweiser Dehnung in den Muskeln M. psoas und M. tibialis anterior aus diabetischen (dBdB) und nicht-diabetischen Tieren (dB+) untersucht. Die passive Kraft zeigte sich in beiden Muskeln nach IR bei dB+ hochsignifikant gesteigert. Die Steigerung fiel in der dBdB-Gruppe deutlich geringer aus. Die relative Steigerung der Durchschnittskraft im M. psoas betrug in der dB+-Gruppe 207% ($p < 0,0001$) und lediglich 46% in der dBdB Gruppe, wobei für diese keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte ($p = 0,0801$).



Im M. tibialis ant. lag die relative Steigerung der Durchschnittskraft in der dB+-Gruppe bei 193% ($p < 0,0001$) und lediglich 98% in der dBdB Gruppe ($p = 0,0165$) (siehe Ab. 3.1.1).

Im M. psoas war in der sham-Gruppe die passive Kraft der dBdB Tiere gegenüber der dB+-Kontrollgruppe gesteigert. So lag im M. psoas die durchschnittliche passive Muskelspannung bei einer Dehnung von 150% der Ausgangslänge 122% über der Kontrolle, was jedoch in diesen Daten keine Signifikanz aufweist ($p = 0,0879$). Im M. tibialis ant. hingegen zeigte sich eine nahezu identische Kraft in den beiden sham-Gruppen mit einer durchschnittlich um 5% nicht signifikant erhöhten passiven

Abb. 3.1.1 passive Kraft in der biomechanischen Fasermessung. Aufgetragen ist jeweils die in einer Gruppe gemessene durchschnittliche Kraft in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der vertikalen Achse gegen die jeweils zugrundeliegende Dehnung der Fasern in Prozent (%) der Ausgangsfaserlänge. Oben dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas) unten dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior). Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionstherapie (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Messwerte wurden durch einen polynomialen Fit zweiter Ordnung korreliert. Auf der rechten Seite zeigen sich die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$, **** entspricht $P \leq 0,0001$

Muskelspannung in dBdB.

Nach *IR* erreichte die dBdB Gruppe im M. psoas die gleiche passive Kraft wie die dB+ Gruppe mit *IR*, während sie im M. tibialis ant. signifikant schwächer war. Die Kraft lag durchschnittlich im M. psoas in der dBdB Gruppe mit *IR* um 5% unter der dB+ Gruppe, ohne dass diese Differenz eine Signifikanz aufwies. Im M. tibialis ant. zeigte sich die passive Kraft in der dBdB Gruppe mit *IR*, verglichen mit der dB+ Gruppe mit *IR*, um 29% reduziert. ($p=0,0028$).

3.1.2 aktive Kraft

Als nächstes wurde die Calcium-induzierte aktive Kraftentwicklung und die Calciumsensitivität untersucht. Auch die aktive Kraft zeigte sich nach *IR* in beiden Muskeln hochsignifikant gesteigert, wobei die Steigerung in der dBdB-Gruppe deutlich geringer ausfiel. So steigerte sich in der dB+-Gruppe die Kraft im M. psoas um durchschnittlich 225% nach *IR* ($p<0,0001$) und im M. tibialis ant. um 132% ($p=0,0002$). In der dBdB-Gruppe steigerte sich die Kraft nach *IR* im Psoas um 42% ($p=0,0244$; entspricht einem Anteil von 19% an der relativen Steigerung in der dB+-Gruppe) und im M. tibialis ant. um 72% ($p=0,4063$; entspricht einem Anteil von 55% an der relativen Steigerung in der dB+-Gruppe), wobei letztere keine statistische Signifikanz aufwies (siehe Abb. 3.1.2).

Muskeldifferenz war die Kraft in der dBdB *sham*-Gruppe gegenüber der dB+-Kontrollgruppe im Durchschnitt gesteigert, wobei diese Abweichung keine statistische Signifikanz aufwies. Im M. psoas lag die durchschnittliche Kraft so 78% über der Kontrolle,

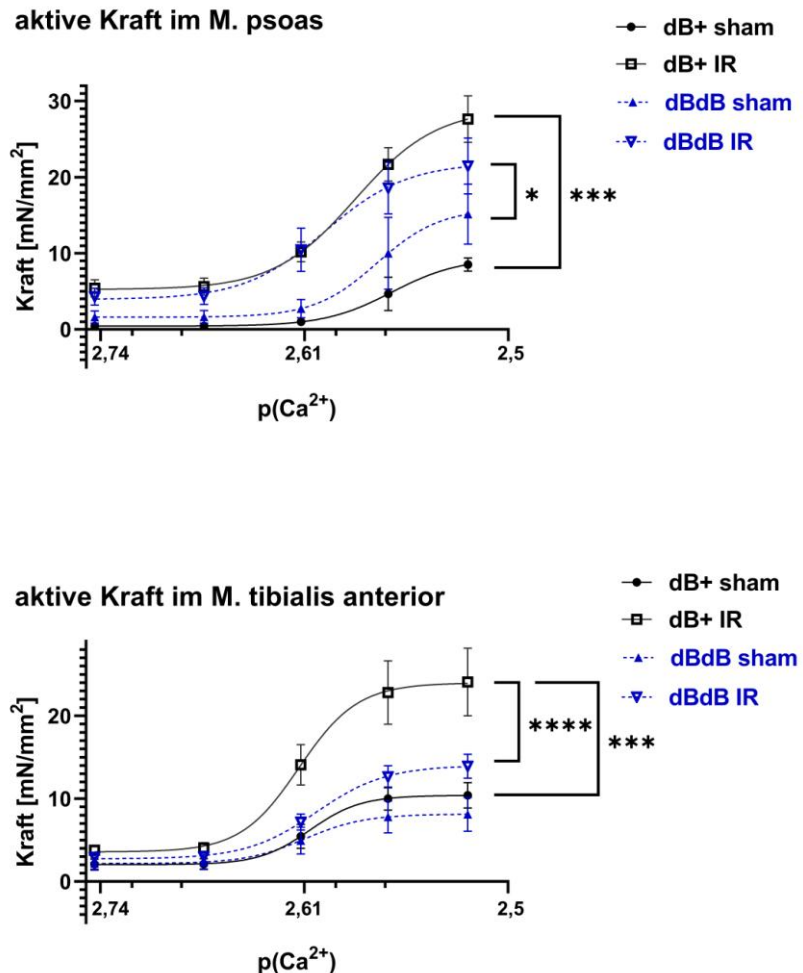


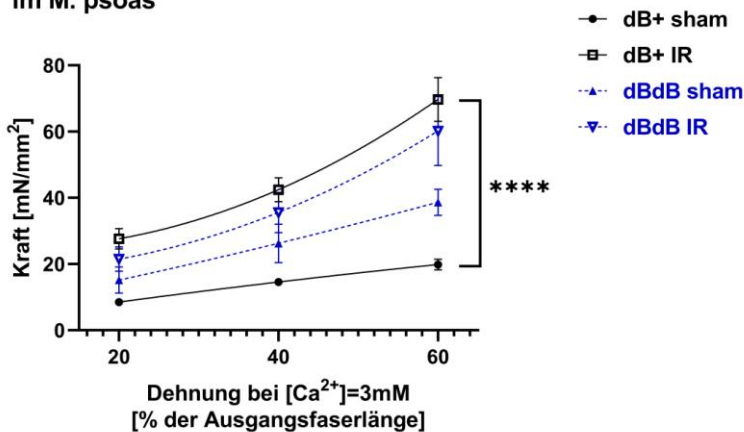
Abb. 3.1.2 aktive Kraft in der biomechanischen Fasermessung. Aufgetragen ist jeweils die in einer Gruppe gemessene durchschnittliche Kraft in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der vertikalen Achse gegen den jeweils zugrundeliegenden negativen dekadischen Logarithmus der Calciumionenkonzentration in der Messlösung ($p(\text{Ca}^{2+})$). Oben dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas) unten dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior). Die Messwerte wurden durch eine sigmoidale Dosis-Antwort-Kurve korreliert. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionstherapie (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Auf der rechten Seite zeigen sich die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P\leq 0,05$, ** entspricht $P\leq 0,01$, *** entspricht $P\leq 0,001$, **** entspricht $P\leq 0,0001$

was jedoch in diesen Daten keine Signifikanz aufwies ($p=0,5352$). Im M. tibialis ant. hingegen zeigte sich eine Reduktion um durchschnittlich 22% in der dBdB Gruppe verglichen mit dB+, wobei auch diese Differenz keine Signifikanz aufwies ($p=0,9752$) (siehe Abb. 3.1.2).

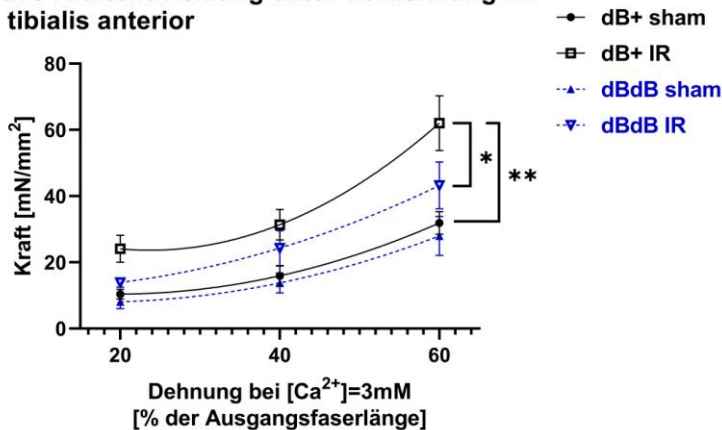
Nach IR erreichte die dBdB Gruppe im Durchschnitt nicht die gleiche Kraft wie die dB+-Gruppe. Die Kraft lag durchschnittlich im M. psoas um 22% unter der Kraft der dB+ Gruppe, ohne dass diese Differenz eine Signifikanz aufwies ($p=0,3335$). Im M. tibialis ant. zeigte sich die aktive Kraft der dBdB Gruppe mit IR, verglichen mit der dB+ Gruppe mit IR, im Durchschnitt um 42% signifikant reduziert ($p<0,0001$).

3.1.3 Maximale aktive Kraft unter Vordehnung

aktive Kraftentwicklung unter Vordehnung im M. psoas



aktive Kraftentwicklung unter Vordehnung im M. tibialis anterior



Zudem bestimmten wir die maximale Kraft, die mit einer passiven Vorspannung in calciumreicher Aktivierungslösung zu erzielen war. Dies diente zur Bestimmung der dehnungsvermittelten Kraftsteigerung in Muskelzellen im Rahmen des Frank-Starling-Mechanismus und dessen Regulation im IR-Modell und bei Diabetes mellitus. Die maximale aktive Kraft unter Vordehnung verhielt sich tendenziell analog zur oben beschriebenen aktiven Kraft der Proben.

Die maximale aktive Kraft unter Vordehnung zeigte sich nach IR ebenfalls in beiden Muskeln hochsignifikant gesteigert und die Steigerung in der dBdB-Gruppe fiel auch hier deutlich geringer aus. So steigerte sich in der dB+-Gruppe die Kraft im M. psoas um durchschnittlich 251% nach IR ($p<0,0001$) und im M. tibialis ant. um 95% ($p=0,0002$). In der dBdB-

Abb. 3.1.3 aktive Kraft unter Vordehnung in der biomechanischen Fasermessung. Aufgetragen ist jeweils die in einer Gruppe gemessene durchschnittliche Kraft in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) auf der vertikalen Achse gegen die jeweils zugrundeliegende Dehnung der Muskelfasern in Prozent (%) der Ausgangsfaserlänge bei einer 3 millimolaren Calciumkonzentration im Messmedium ($[\text{Ca}^{2+}]=3\text{mM}$). Oben dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas) unten dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior). Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionstherapie (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Messwerte wurden durch einen polynomialen Fit zweiter Ordnung korreliert. Auf der rechten Seite zeigen sich die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P\leq 0,05$, ** entspricht $P\leq 0,01$, *** entspricht $P\leq 0,001$, **** entspricht $P\leq 0,0001$

Gruppe steigerte sich die durchschnittliche Kraft nach *IR* im Psoas um 54% ($p=0,2316$; entspricht einem Anteil von 22% an der relativen Steigerung in der dB+-Gruppe) und im M. tibialis ant. um 54% ($p=0,4063$; entspricht einem Anteil von 58% an der relativen Steigerung in der dB+-Gruppe), was in beiden Fällen keine statistische Signifikanz zeigte (siehe Abb. 3.1.3).

Muskeldifferent war die Kraft in der dBdB *sham*-Gruppe gegenüber der dB+-Kontrollgruppe im Durchschnitt gesteigert, wobei diese Abweichung keine statistische Signifikanz aufwies. Im M. psoas lag die durchschnittliche Kraft so 95% über der Kontrolle, was jedoch in diesen Daten keine Signifikanz aufweist ($p=0,4075$). Im M. tibialis ant. hingegen zeigte sich eine Reduktion um durchschnittlich 14% in der dBdB Gruppe verglichen mit dB+, wobei auch diese Differenz keine Signifikanz aufwies ($p=0,9752$). Zudem zeigte sich im Kurvenverlauf die Steigung, entsprechend der längenabhängigen Kraftzunahme, nach *IR* sowohl bei dB+ als auch bei dBdB gesteigert.

Nach *IR* erreichte die dBdB Gruppe im Durchschnitt nicht die gleiche Kraft wie die dB+-Gruppe. Die Kraft lag durchschnittlich im M. psoas um 14% unter der dB+ Gruppe, ohne dass diese Differenz eine Signifikanz aufwies ($p=0,3393$). Im M. tibialis ant. zeigte sich die Gruppe verglichen mit der dB+ Gruppe mit *IR* im Durchschnitt um 30% signifikant schwächer ($p<0,0001$).

3.1.4 Kalziumsensitivität

Zur Messung der Kalziumsensitivität wurden die Muskelfasern zur Aktivierung in Lösungen mit stufenweise ansteigender Kalziumionenkonzentration getaucht und die generierte aktive Kraftantwort registriert. Die Kalziumsensitivität zeigte sich muskeldifferent in M. psoas nach *IR* erhöht. So erreichte in der dB+ Gruppe bei einer Kalziumionenkonzentration ($c(\text{Ca}^{2+})=2,7\text{mM}$) eine um 109% signifikant erhöhte Sensitivität ($p=0,0009$). Analog dazu steigerte sich die Kalziumsensitivität in der dBdB-Gruppe nach *IR* ebenfalls um durchschnittlich 97% ($p=0,0017$), was einem Anteil von 89% der Steigerung in der dB+-Gruppe entsprach. Die Genotypen verhielten sich also im M. psoas annähernd gleich.

Im M. tibialis ant. zeigten die Tiere der dBdB Gruppe mit *IR* eine mit der dB+ Gruppe mit *IR* verglichen signifikant reduzierte Kalziumsensitivität. So war die Sensitivität in der Gruppe bei $c(\text{Ca}^{2+})=2,4\text{mM}$ 14% geringer als in der dB+ Gruppe ($p=0,0005$). Letztere war dabei im Vergleich zur *sham*-Gruppe um 4% gesteigert, was hier allerdings keine statistische Signifikanz zeigte ($p=0,2089$) (siehe Abb. 3.1.4).

Im intermuskulären Vergleich zeigte sich für alle Gruppen außer der dBdB Gruppe nach *IR* bei $p(\text{CA}^{2+})=2,4\text{mM}$ eine deutlich höhere Kalziumsensitivität im M. tibialis ant. als im M. psoas. Dieser Unterschied betrug in der dB+ *sham*-Gruppe 604% ($p=0,0749$) und in der dBdB *sham*-Gruppe 454% ($p=0,0382$). Nach *IR* reduzierte sich der Unterschied in der dB+-Gruppe auf lediglich 82% ($p=0,0253$) und in der dBdB-Gruppe auf nur 10%, wobei sich der Unterschied hier nicht mehr signifikant zeigte ($p>0,9999$).

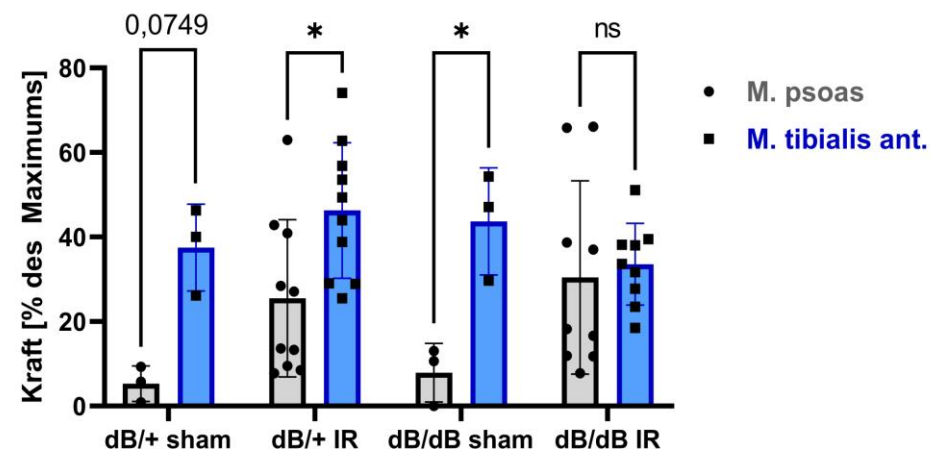
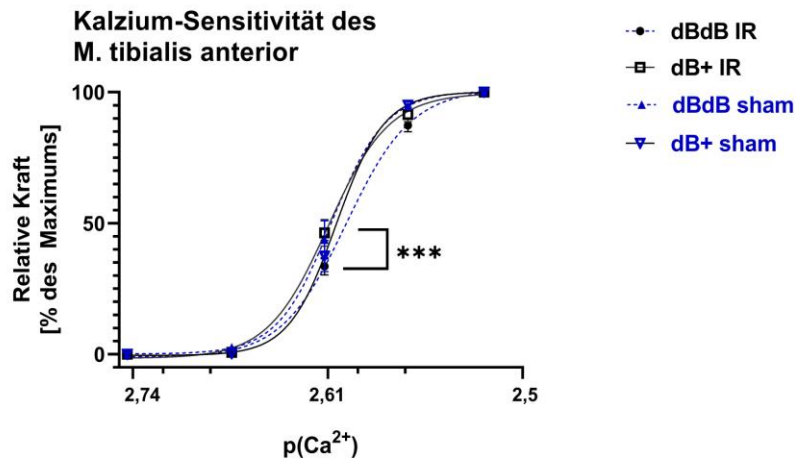
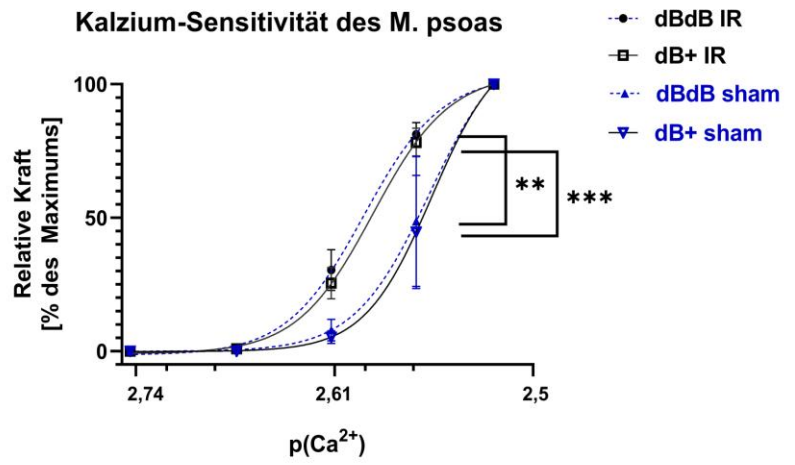
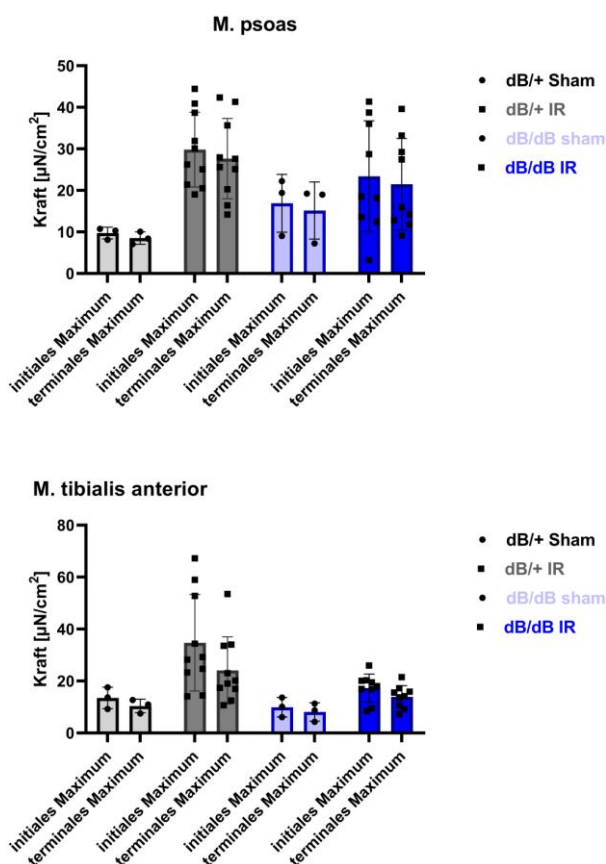


Abb. 3.1.4 Calciumsensitivität der Muskelfasern in der biomechanischen Fasermessung. Aufgetragen ist jeweils die in einer Gruppe gemessene durchschnittliche relative Kraft in Prozent der von der Faser erreichten Maximalk auf der vertikalen Achse gegen den jeweils zugrundeliegenden negativen dekadischen Logarithmus der Calciumionenkonzentration in der Messlösung ($p(\text{Ca}^{2+})$). Oben dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas) unten dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior). Die Messwerte wurden durch eine sigmoidale Dosis-Antwort-Kurve korreliert. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionsbehandlung (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Unten: Dargestellt ist der Anteil der maximalen aktiven Muskelkraft, die bei einem $p(\text{Ca}^{2+})$ von 2,61 in den einzelnen Gruppen jeweils in den beiden unterschiedlichen Muskeln erreicht wurden. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$, **** entspricht $P \leq 0,0001$

3.1.5 Konsistenzprüfung der aktiven Kräfte



Die aktiven Kräfte zeigten sich im Verlauf der Messungen mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen des Messmediums konsistent. Bei dem Vergleich der maximalen aktiven Kraft vor und nach Messung in der Calcium-Reihe, zeigte sich für keine Gruppe in den untersuchten Muskel eine signifikante Reduktion der Kraft. Die in den Daten ersichtliche leichte Reduktion des Durchschnittswertes ist in allen Muskeln vergleichbar und wurde in keinem Datensatz signifikant (siehe Abb. 3.1.5).

Folglich ist nicht davon auszugehen, dass beobachtete Unterschiede in der gemessenen aktiven Kraft bei Vordehnung oder variiertes Kalziumionenkonzentration auf eine unterschiedliche Ermüdung der jeweiligen Fasergruppen zurückzuführen sind.

Abb. 3.1.5 Konsistenzprüfung der aktive Kraft in der biomechanischen Fasermessung. Aufgetragen ist jeweils die in einer Gruppe gemessene durchschnittliche Kraft in Milinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm^2) bei einer 3 milimolaren Calciumkonzentration im Messmedium ($[\text{Ca}^{2+}]=3\text{mM}$) jeweils vor (initiales Maximum) und nach (terminales Maximum) den durchgeführten aktiven Kraftmessungen. Oben dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas) unten dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior). Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor- Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor- Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionstherapie (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Es liegen im Datensatz keine signifikanten Differenzen vor.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Titingehalt

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden molekularbiologischen Messungen wurde eine größere Zahl unterschiedlicher Muskelproben untersucht. Wie in der Einleitung angedeutet, könnte die mechanische und metabolische Ausgangssituation in unterschiedlichen Muskelfasertypen die dortigen Folgen einer myokardialen Ischämie beeinflussen. Um ein breiteres Spektrum zu erfassen wurden hier fünf verschiedene Muskeln mit unterschiedlichen Faserexpressionmustern betrachtet.

Der Titingehalt der Muskelproben zeigte sich nach *IR* teilweise signifikant reduziert. Gemessen wurde die Bandenintensität der T1-Titinbande normiert auf die Ladekontrolle Myosin in den Geldirektfärbungen. Analog zu den hier erhobenen Befunden verhielt sich zudem die Messung der Bandenintensität der T2-Titinbande, also der spezifischen Degradationsbande von Titin.

Im *M. tibialis ant.* zeigte sich hier eine Reduktion in der dB+-Gruppe mit *IR* verglichen mit der *sham*-Gruppe von durchschnittlich 52% ($p=0,0024$) (siehe Abb. 3.2.1). Diese Reduktion zeigte sich allerdings nur in Präsenz eines einzelnen verhältnismäßig hohen Ratios in einem Tier der dB+ *sham*-Gruppe signifikant und ist daher kritisch zu betrachten. Sie fand sich jedoch auch in der Betrachtung der T2-Bande. Hier kam es im *M. tibialis ant.* in der dB+ Gruppe nach *IR* zu einer Reduktion des durchschnittlichen Gehaltes von 40% verglichen mit dB+ *sham* Gruppe ($p=0,0551$) (siehe Abb. 3.2.2).

Außerdem zeigte sich der Titingehalt bei dBdB-Tieren teilweise signifikant geringer als bei dB+-Tieren. Im *M. tibialis ant.* zeigte sich eine Reduktion um durchschnittlich 45% in der dBdB *sham*-Gruppe gegenüber der dB+ *sham*-Gruppe ($p=0,0301$). Auch bei der Betrachtung der T2-Bande findet sich im TA eine signifikante Reduktion von 52% des durchschnittlichen Gehaltes in der dBdB *sham*-Gruppe verglichen mit der dB+ *sham*-Gruppe ($p=0,0454$).

Ein gleichartiges Verhältnis der Durchschnittswerte findet sich im *M. soleus* bei einer Betrachtung der T1-Bande. Hier findet sich eine Reduktion um durchschnittlich 61%, die jedoch keine statistische Signifikanz aufweist ($p=0,1877$). Analog dazu fand sich im *M. psoas* der Trend, dass der Titingehalt in der dBdB-Gruppe mit *IR* im Durchschnitt 24% geringer war, als der in der dB+- Gruppe mit *IR* ($p=0,0946$). Dem entsprachen ebenfalls die Durchschnittswerte im *M. EDL* dieser beiden Gruppen. Hier zeigte sich eine Reduktion um durchschnittlich 39%, die jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz aufwies ($p=0,1808$) (siehe Abb. 3.2.1).

Bei einer Betrachtung der T2-Bande, zeigte sich zudem teilweise ein signifikant geringer Gehalt in der dBdB-Gruppe nach *IR*, als in der dB+ Gruppe nach *IR*. So bestand im *M. psoas* ein um durchschnittlich 27% geringerer Gehalt ($p=0,0454$). Das gleiche Verhältnis findet sich auch in der Betrachtung der T1-Bande im *M. psoas*, jedoch zeigte sich diese im Datensatz nicht signifikant ($p=0,0946$).

Im intermuskulären Vergleich fällt auf, dass der Titingehalt im *M. EDL* sowohl besonders hohe Werte als auch eine besonders starke Streuung erreicht. Dieser Befund fand sich sowohl bei der Betrachtung der T1- als auch der T2-Bande. So liegt der Durchschnittswert in allen Gruppen über dem der jeweiligen anderen Muskeln, erreicht jedoch lediglich in der dB+-Gruppe mit *IR* bei einer Erhöhung um 155% einen signifikanten Unterschied (geringster p-Wert= 0,0018 im Vergleich zum *M. tibialis ant.*).

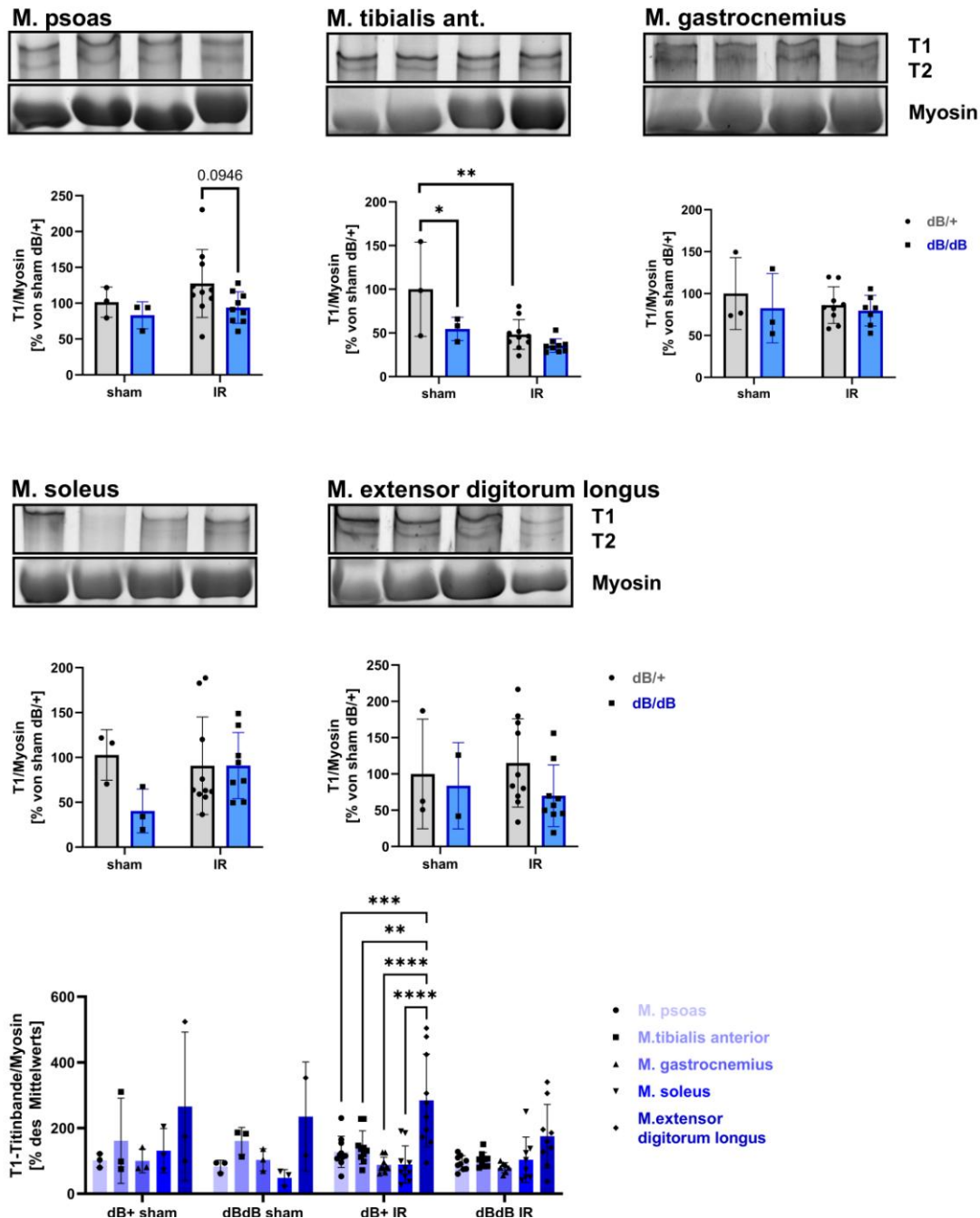


Abb. 3.2.1 Betrachtung des relativen Titingehalts in Skelettmuskelzellen. Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der undegradieren Titinbande (T1) normiert auf die Myosinbande in der Geldirektfärbung nach Elektrophorese. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperusionsbehandlung (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent des arithmetischen Mittels der Messwerte in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balken symbolisieren das 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarzen Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$, **** entspricht $P \leq 0,0001$. Dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Musculus gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (M. extensor digitorum longus). Oberhalb der Balkendiagramme sind exemplarische Fotografien der Geldirektfärbungen aus den jeweiligen Probensätzen dargestellt. Die Auftragung entspricht hierbei der X-Achse des Balkendiagrammes. Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der T1-Bande normiert auf die Intensität der Myosinbande der jeweiligen Proben. Hier erfolgte die Auftragung in Prozent des Mittelwerts in der Probe von dB+ sham im M. psoas zum intermuskulären Vergleich.

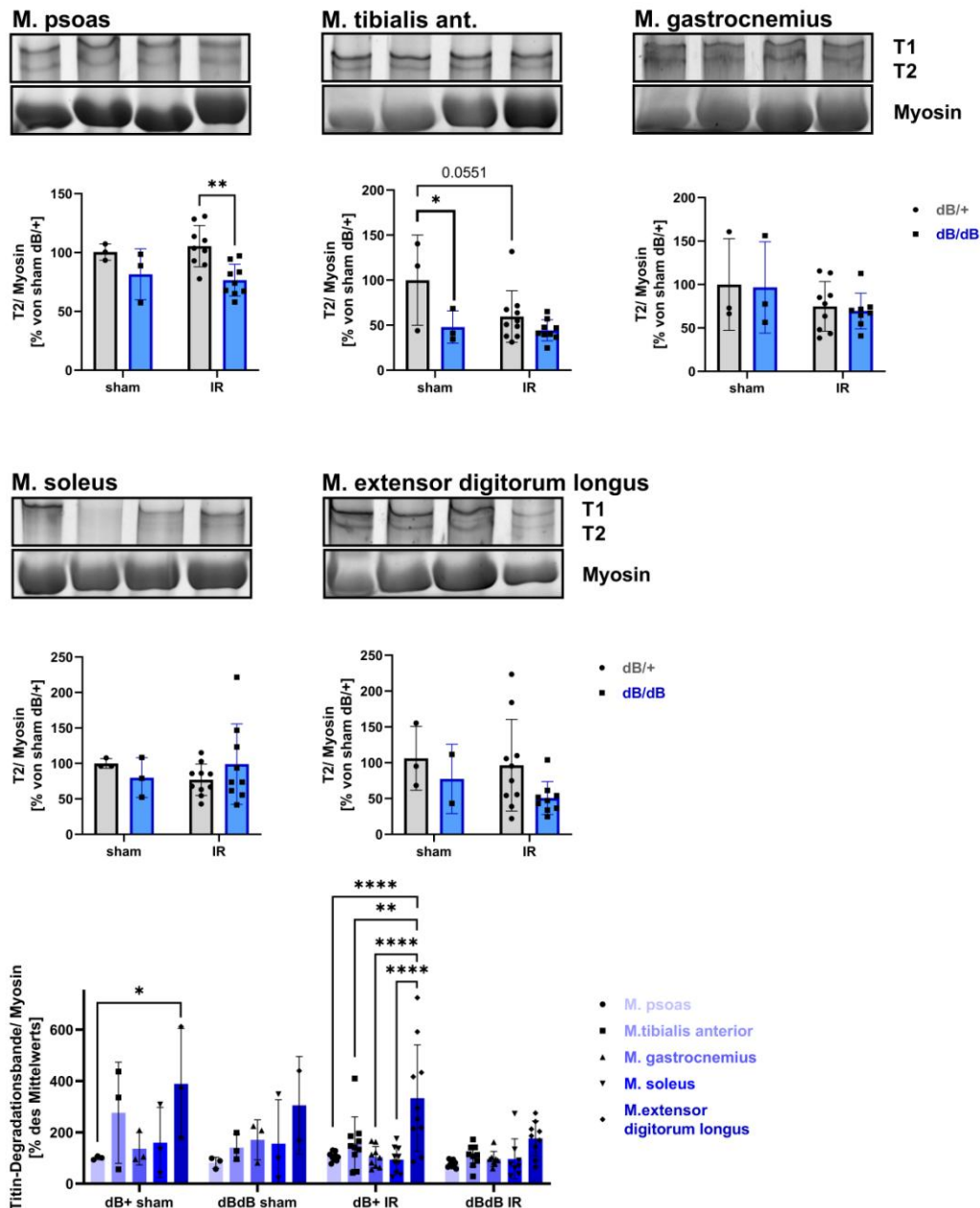


Abb. 3.2.2 Betrachtung der Titindegredation in Skelettmuskelzellen. Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der degradierten Titinbande (T2) normiert auf die Myosinbande in der Geldirektfärbung nach Elektrophorese. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperusionsbehandlung (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent des arithmetischen Mittels der Messwerte in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balken symbolisieren das 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarzen Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P < 0,05$, ** entspricht $P < 0,01$, *** entspricht $P < 0,001$, **** entspricht $P < 0,0001$. Dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Musculus gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (M. extensor digitorum longus). Oberhalb der Balkendiagramme sind exemplarische Fotografien der Geldirektfärbungen aus den jeweiligen Probensätzen dargestellt. Die Auftragung entspricht hierbei der x-Achse des Balkendiagramms. Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der T2-Bande normiert auf die Intensität der Myosinbande der jeweiligen Proben. Hier erfolgte die Auftragung in Prozent des Mittelwerts in der Probe von dB+ sham im M. psoas zum intermuskulären Vergleich.

3.2.2 Titindegredation

Zur Normierung einer Titindegredation nicht nur auf die vorliegende Proteinmenge anhand von Myosin, sondern auch auf die Expression intakten Titins in einer Muskelprobe, erfolgte zudem der Vergleich des Degradationsproduktes mit der T1-Bande. Hierbei zeigten sich teilweise signifikante Differenzen (siehe Abb. 3.2.3).

So zeigte sich das Verhältnis nach *IR* teilweise signifikant reduziert. Es reduzierte sich im Durchschnitt im M. EDL nach *IR* in der dB+-Gruppe um 25% ($p=0,1513$) und in der dBdB-Gruppe um 24% ($p=0,1826$), wobei diese Reduktionen keine Signifikanz aufwiesen. Im M. soleus reduzierte sich das durchschnittliche Verhältnis in der dBdB-Gruppe signifikant um 58% ($p=0,0003$). Diese Signifikanz beruht jedoch auf zwei besonders hohen Messwerten in der dBdB Gruppe und muss daher kritisch betrachtet werden. Der Trend ließ sich jedoch auch im M. gastrocnemius beobachten, in dem das Verhältnis durchschnittlich um 27% sank ($p=0,0747$). Hierbei wurde ebenfalls keine Signifikanz in den Daten erreicht. Im Unterschied zu diesen Daten zeigte sich im M. tibialis ant. in der dBdB-Gruppe nach *IR* ein Anstieg in Höhe von durchschnittlich 38%, der jedoch auch keine Signifikanz erreichte ($p=0,1213$).

Es zeigte sich zudem im M. soleus eine signifikante Erhöhung des Verhältnisses in der dBdB *sham*-Gruppe gegenüber der dB+ *sham*-Gruppe. Sie betrug durchschnittlich 136% ($p=0,0027$). Diese nachgewiesene Signifikanz unterliegt ebenfalls den oben beschriebenen Einschränkungen und ist daher auch kritisch zu betrachten.

In intermuskulären Vergleich zeigte sich in der dBdB *sham* -Gruppe ebenfalls, dass das Verhältnis im M. soleus am stärksten streut und die höchsten Werte erreicht. Es lag durchschnittlich 146% über dem Durchschnitt der anderen Muskeln (im Vergleich zum M. gastrocnemius $p=0,0005$). Auch diese nachgewiesene Signifikanz unterliegt den oben beschriebenen Einschränkungen und ist daher kritisch zu betrachten.

Außerdem zeigte sich, dass verglichen mit der relativen Veränderung des Verhältnisses innerhalb der Muskeln nach *IR* der M. tibialis ant. höhere Werte zeigte, während sie beim M. EDL reduziert waren. Die Steigerung im M. tibialis ant. betrug dabei in der dB+-Gruppe verglichen mit dem Durchschnitt 27%. Die Reduktion im M. EDL betrug in der dB+-Gruppe durchschnittlich 23%. Für sich genommen zeigten sich diese Effekte statistisch nicht signifikant, jedoch im Vergleich zueinander (in der dB+ Gruppe: $p=0,0048$, in der dBdB- Gruppe $p=0,0631$). Es kommt also vermeintlich zu einer differentiellen Regulation innerhalb dieser Muskeln, ob jedoch eine Steigerung im M. tibialis ant., eine Reduktion im M. EDL oder beides gleichzeitig geschieht, lässt sich hier nicht differenzieren.

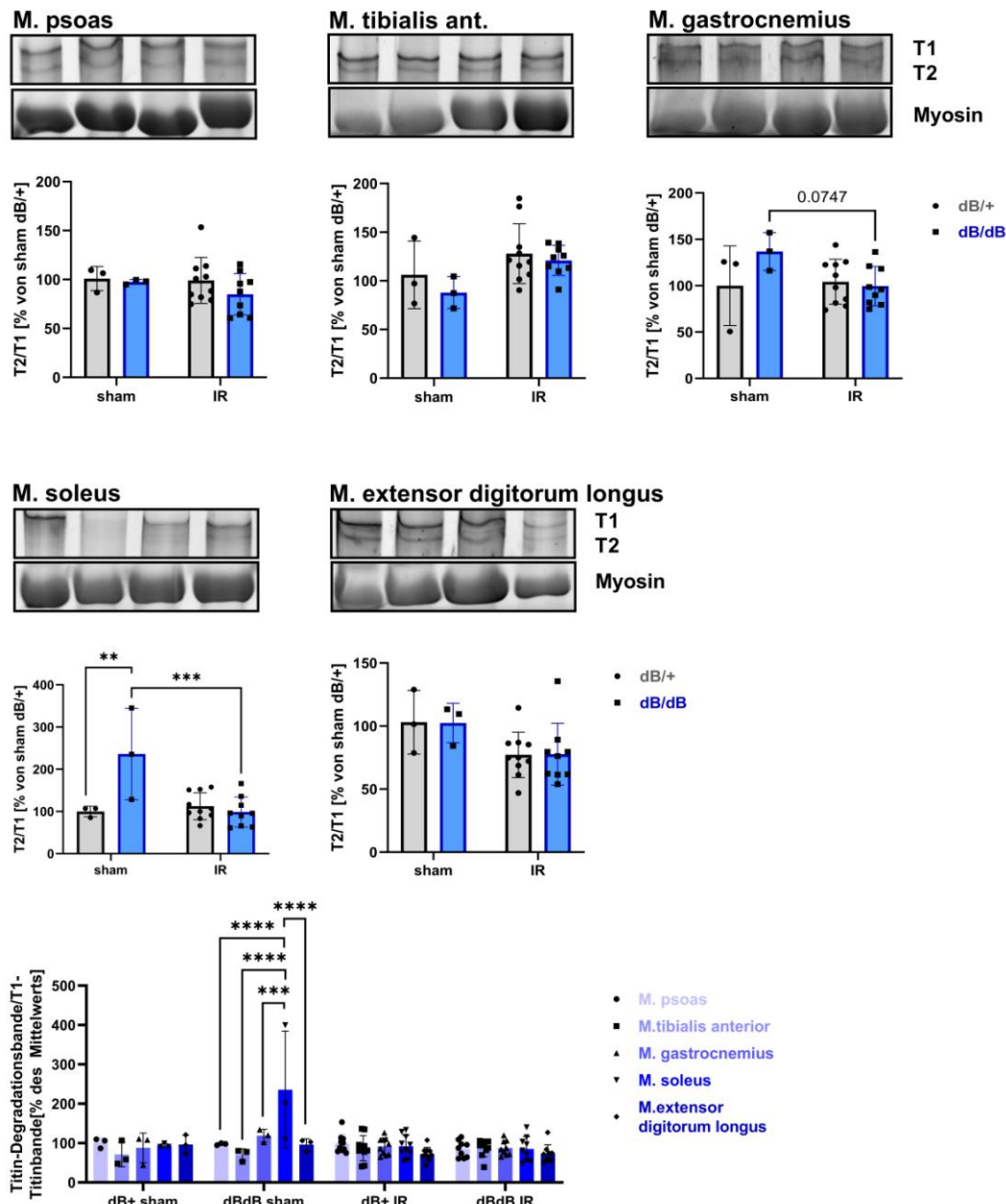


Abb. 3.2.3 Betrachtung der relativen Titindegredation in Skelettmuskelzellen. Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der degradierten Titinbande (T2) normiert auf die undegradierete Titinbande (T1) in der Geldirektfärbung nach Elektrophorese. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperusionsbehandlung (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent des arithmetischen Mittels der Messwerte in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balken symbolisieren das 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarzen Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$, **** entspricht $P \leq 0,0001$. Dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Musculus gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (M. extensor digitorum longus). Oberhalb der Balkendiagramme sind exemplarische Fotografien der Geldirektfärbungen aus den jeweiligen Probensätzen dargestellt. Die Auftragung entspricht hierbei der X-Achse des Balkendiagrammes. Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der T2-Bande normiert auf die Intensität der T1-Bande der jeweiligen Proben. Hier erfolgte die Auftragung in Prozent des Mittelwerts in der Probe

3.2.3 Titinphosphorylierung

Einzelne Tiere wiesen nach *IR* im Durchschnitt eine erhöhte Phosphorylierung von Serin12022 in der PEVK-Region des Titinproteins auf. Dies lag im *M. psoas* und *M. soleus* insbesondere in der dBdB-Gruppe vor, zeigte in der Gesamtheit der dargestellten Daten jedoch keine Signifikanz (*M. psoas* dBdB-Gruppe: $p=0,2990$; *M. soleus* dBdB-Gruppe: $p=0,2913$) (siehe Abb. 3.2.4).

Teilweise war außerdem die durchschnittliche Phosphorylierung in den dBdB-Gruppen gegenüber den dB+-Gruppen reduziert. So zeigte sich im *M. psoas* eine Reduktion der Durchschnittswerte von 33% in der *sham*-Gruppe ($p=0,1705$) und 18% in den *IR* Gruppe ($p=0,1743$). Beide Effekte erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Im intermuskulären Vergleich zeigte sich im *M. soleus* verglichen mit den anderen Muskeln nach *IR* eine durchschnittlich erhöhte Phosphorylierung. Diese zeigte sich in der dB+-Gruppe um durchschnittlich 88% erhöht und signifikant unterschiedlich zur Phosphorylierung im *M. psoas* ($p=0,0466$) und im *M. gastrocnemius* ($p=0,0115$). In der dBdB-Gruppe zeigte sich die Erhöhung von durchschnittlich 129% zu allen anderen Muskeln signifikant (im Vergleich mit *M. EDL*: $p=0,0115$).

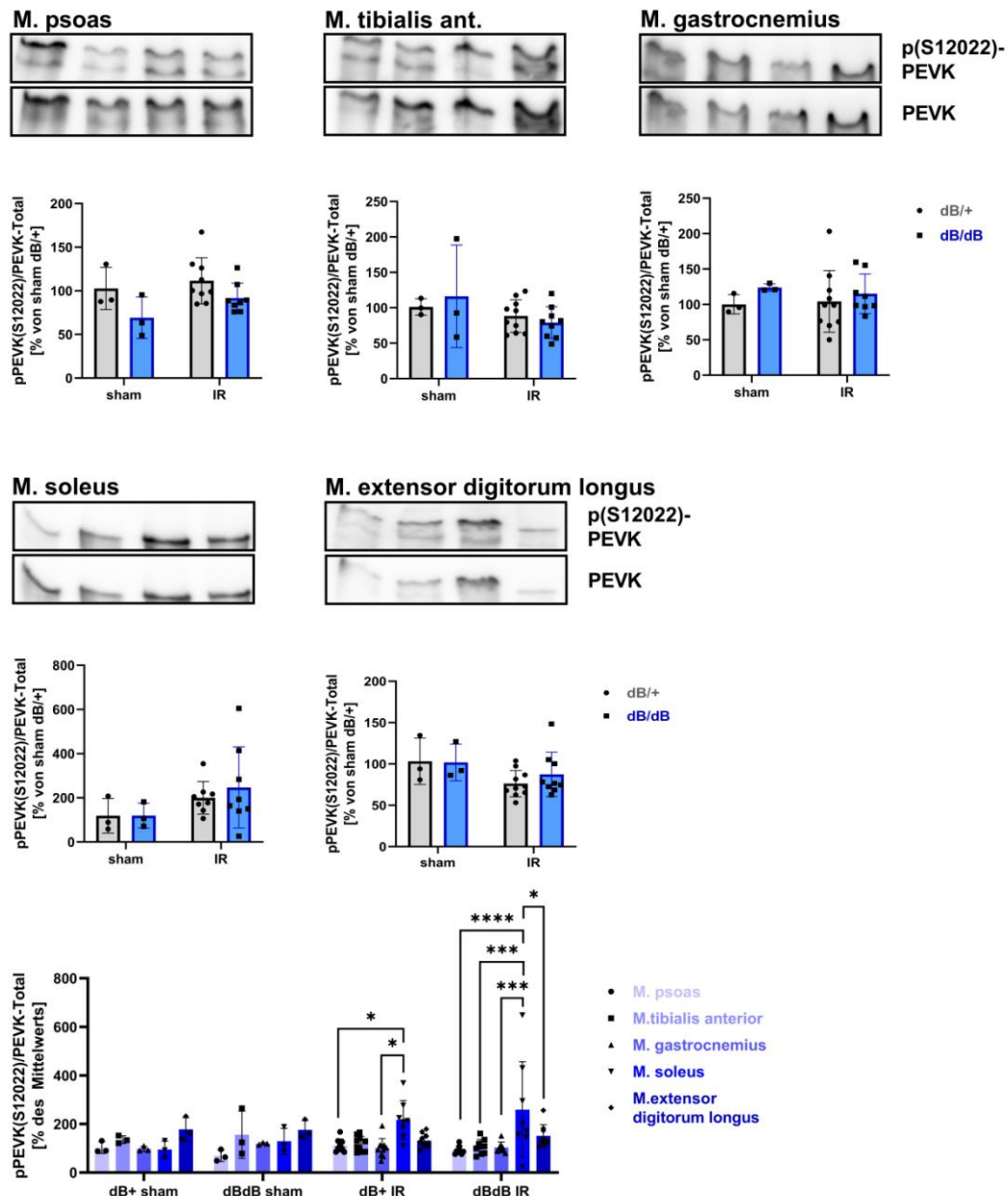


Abb. 3.2.4 Betrachtung der Titinphosphorylierung an Serin12022 (p(S12022)) in Skelettmuskelzell
Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der Bande in der Immunfärbung von an Serin12 phosphoryliertem Titin normiert auf die Intensität der Bande in der Immunfärbung der Prolin-, Glutamin- und Lysinreiche PEVK-Region (PEVK) nach *Western Blot*. Verglichen wurden Faserproben Mäusen mit einer genetisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusion (IR) andere lediglich eine Sham-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent des arithmetischen Mittels der Messwerte in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balken symbolisieren 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarzen Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Musculus gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (M. extensor digitorum longus).
Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der p(S12022)-Bande normiert auf die Intensität der PEVK-Bande in den jeweiligen Proben. Hier erfolgte die Auftragung in Prozent des Mittelwerts in der Probe von dB+ sham im Musculus psoas zum intermuskulären Vergleich. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$, **** entspricht $P \leq 0,0001$.

3.2.4 Proteinkinase Ca

Der Gesamtgehalt an Proteinkinase Ca (PKC α) normiert auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle zeigte sich nur in einzelnen Tieren nach *IR* erhöht. Dies betraf die Muskeln M. psoas und m. tibialis ant. und blieb ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz. (siehe Abb. 3.2.5).

Im intermuskulären Vergleich zeigt sich die Steigerung der Expression im M. psoas verglichen mit den anderen Muskeln nach *IR* signifikant erhöht. In der dB+-Gruppe lag diese 113% über dem Durchschnitt der anderen Muskeln (signifikant unterschiedlich zu M. gastrocnemius: $p=0,0074$ und M. EDL: $p=0,0124$). In der dBdB Gruppe zeigte sich eine hochsignifikante Erhöhung um 181% im Vergleich mit den anderen Muskeln (verglichen mit M. tibialis ant.: $p=0,0001$). Dieser Unterschied verhält sich vergleichbar mit der Gesamtmenge an AMPK (s.u.).

Die Phosphorylierung von Serin660 an der PKC α nimmt nach *IR* signifikant ab (siehe Abb. 3.2.6). Im M. gastrocnemius zeigte sich in der dB+-Gruppe eine Abnahme um 22% ($p=0,0479$), im M. EDL um 41% ($p=0,0006$) und im M. tibialis ant. von durchschnittlich 28% ($p=0,1409$), nur in den beiden Erstgenannten eine Signifikanz erreicht wurde. Im M. tibialis ant. zeigte sich zudem eine signifikante Abnahme in der dBdB-Gruppe nach *IR* um 41% ($p=0,0138$).

Die Phosphorylierung ist außerdem teilweise in der dBdB-Gruppe signifikant reduziert. So zeigte sich eine Abnahme in der dBdB *sham*-Gruppe verglichen mit der dB+ *sham*-Gruppe im M. gastrocnemius von 29% ($p=0,0356$) und im M. EDL von 28% ($p=0,0522$). Diesen Unterschied zeigten beide Gruppen nach *IR* nicht mehr.

Im intermuskulären Vergleich zeigte sich ein klares muskelspezifisches Phosphorylierungsmuster, das in allen Gruppen erhalten blieb. Dabei fand sich die höchste Phosphorylierung im M. gastrocnemius und M. soleus. M. gastrocnemius wies in der Gruppe dB+ mit *IR* eine um 87% gesteigerte Phosphorylierung verglichen mit M. psoas auf ($p<0,0001$). M. soleus wies in der gleichen Gruppe eine um 59% gesteigerte Phosphorylierung verglichen mit M. psoas auf ($p=0,0001$). Diese Unterschiede waren in allen Gruppen signifikant außer in der dBdB *sham*-Gruppe. Hier gab sich kein Anhalt für eine differente Regulierung, wofür eventuell die geringe n-Zahl in dieser Gruppe bei gleichzeitig erhöhter Streuung der Daten verantwortlich sein könnte. Die Phosphorylierung im M. tibialis ant. stellt sich verglichen mit dem M. psoas in der dB+-Gruppe mit *IR* um 60 % geringer da ($p<0,0001$). Da diese Verhältnisse in allen Gruppen annähernd konstant bleiben, zeigt sich kein Anhalt für eine Variation innerhalb der Variablen des Experimentes.

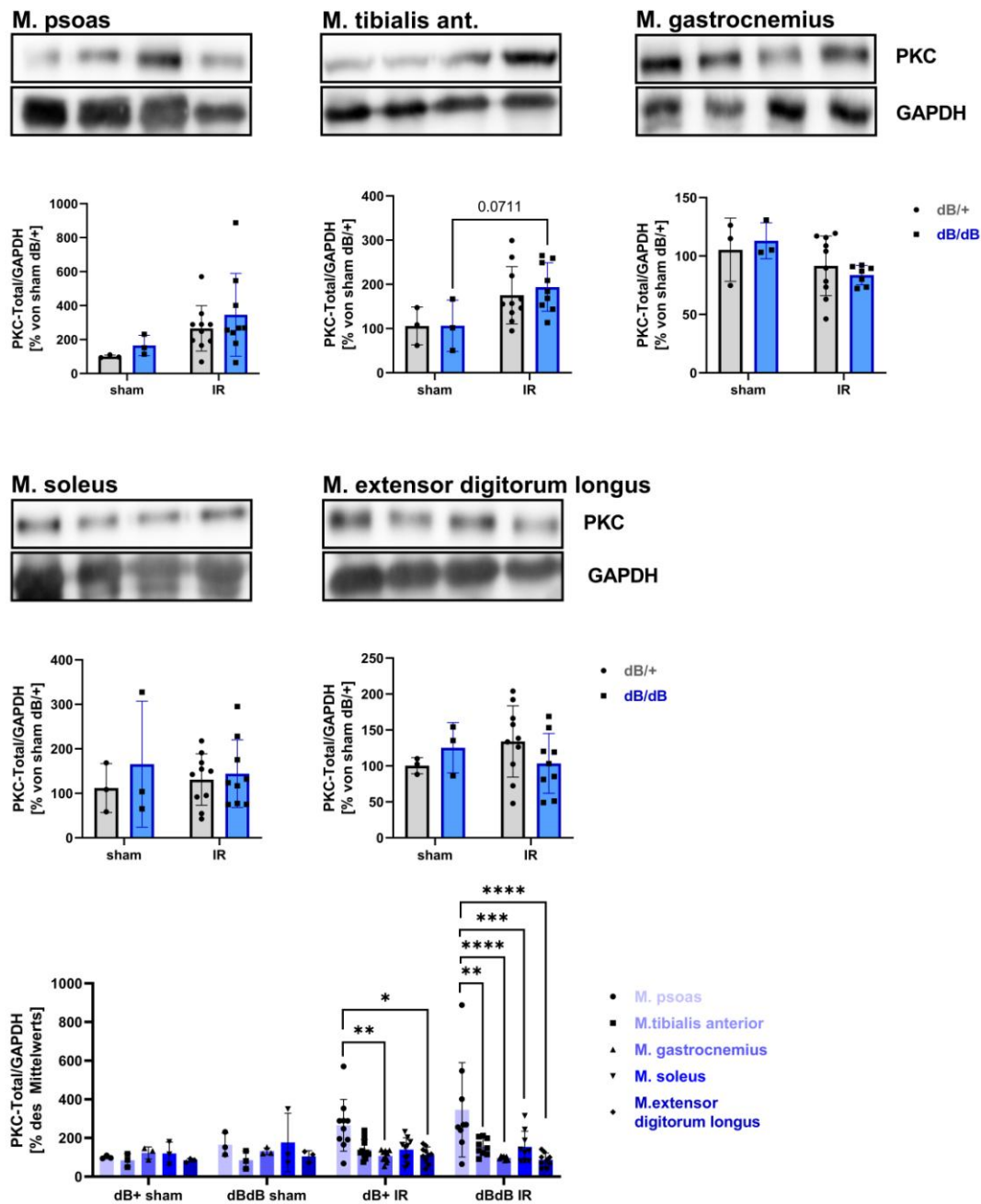


Abb. 3.2.5 Betrachtung der Proteinkinase Ca (PKC α)-Konzentration in Skelettmuskelzellen. Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der Bande in der Immunfärbung von PKC α normiert auf die Intensität der Bande der Ladekontrolle Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nach *Western Blot*. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionbehandlung (IR) andere lediglich eine *Sham*-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent des arithmetischen Mittels der Messwerte in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balken symbolisieren das 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarzen Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0.05$, ** entspricht $P \leq 0.01$, *** entspricht $P \leq 0.001$, **** entspricht $P \leq 0.0001$. Dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Musculus gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (M. extensor digitorum longus). Oberhalb der Balkendiagramme sind exemplarische Fotografien der Immunfärbungen aus den jeweiligen Probenansätzen dargestellt. Die Auftragung entspricht hierbei der x-Achse des Balkendiagramms. Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der PKC α -Bande normiert auf die Intensität der GAPDH-Bande der jeweiligen Proben. Hier erfolgte die Auftragung in Prozent des Mittelwerts in der Probe von dB+ sham im M. psoas zum intermuskulären Vergleich. 70

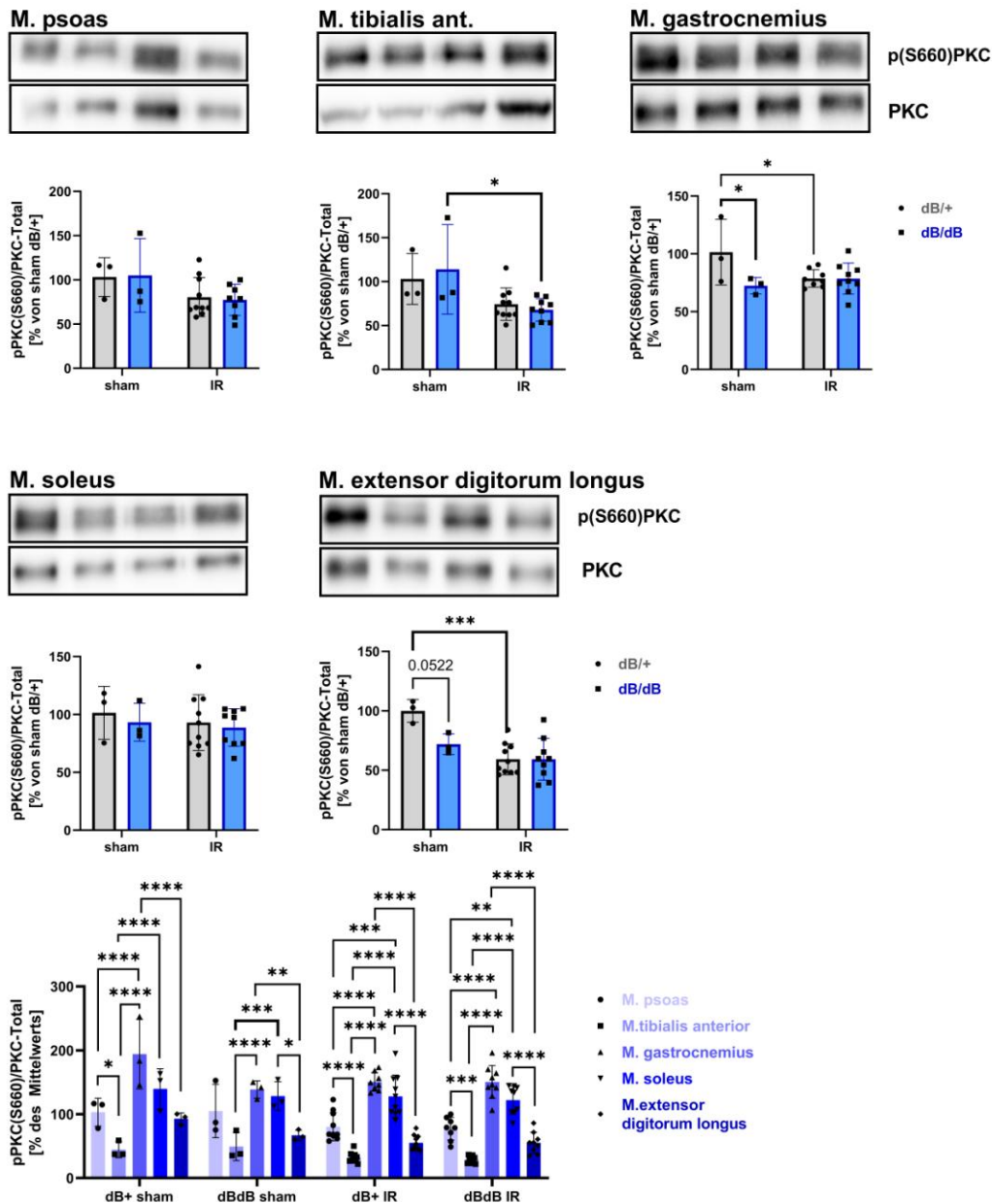


Abb. 3.2.6 Betrachtung der Proteinkinase Ca (PKC α)-Phosphorylierung an Serin660 (p(S660)PKC) Skelettmuskelzellen. Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der Bande in der Immunfärbung v p(S660)PKC normiert auf die Intensität der Bande der PKC nach *Western Blot*. Verglichen wurde Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen v Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB/dB). Von diesen wiederum erhielten einige ei mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionsbehandlung (IR) andere lediglich eine *Sha* Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent c arithmetischen Mittels der Messwerte in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balk symbolisieren das 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarze Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Die Bezugslinien zeigen c P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differe tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspric P \leq 0,05, ** entspricht P \leq 0,01, *** entspricht P \leq 0,001, **** entspricht P \leq 0,0001. Dargestellt sind c Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Muscul gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (l extensor digitorum longus). Oberhalb der Balkendiagramme sind exemplarische Fotografien c Immunfärbungen aus den jeweiligen Probensätzen dargestellt. Die Auftragung entspricht hierbei der x-Achse des Balkendiagramms. Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der p(S660)PKC α -Bande normiert z die Intensität der PKC α -Bande der jeweiligen Proben. Hier erfolgte die Auftragung in Prozent des Mittelwerts in der Probe von dB+ sham im M. psoas zum intermuskulären Vergleich.

3.2.5 Adenosin-monophosphat-abhängige Kinase

Die Gesamtmenge der Adenosin-monophosphat-abhängigen Kinase (AMPK) normiert auf GAPDH verhält sich nach *IR* je nach Muskel in der dBdB-Gruppe signifikant unterschiedlich. Einerseits steigt im M. *psoas* in der dBdB-Gruppe nach *IR* die Gesamtmenge um durchschnittlich 156% ($p=0,0228$), sinkt jedoch andererseits im M. *EDL* um 47% ($p=0,0588$) (siehe Abb. 3.2.7).

Auch beim Vergleich der Gesamtmenge an AMPK zwischen den beiden Gruppen mit *IR* zeigen sich muskeldifferent signifikante Unterschiede. Im M. *psoas* liegt sie in der dBdB-Gruppe mit *IR* durchschnittlich 52% höher als in der dB+-Gruppe mit *IR* ($p=0,0292$). Im M. *EDL* beträgt sie jedoch durchschnittlich 47% weniger ($p=0,0028$).

Im intermuskulären Vergleich findet sich in der dB+ *sham*-Gruppe eine Erhöhung im M. *tibialis ant.* Diese beträgt verglichen mit dem Durchschnitt 182% und zeigte sich zu den Werten vom M. *gastrocnemius*, M. *soleus* und M. *EDL* signifikant (verglichen mit M. *soleus*: $p=0,0232$). Allerdings beruhen diese Unterschiede auf einem einzelnen hohen Wert in der dBdB *sham*-Gruppe und müssen daher kritisch betrachtet werden.

Nach *IR* zeigt sich eine relativ höhere Menge an AMPK im M. *psoas*. Im Vergleich mit dem Durchschnitt der anderen Muskeln ist diese in der dB+-Gruppe um 96% erhöht (verglichen mit M. *tibialis ant.*: $p=0,0041$) und in der dBdB-Gruppe um 251% erhöht ($p<0,0001$). Dieser Unterschied verhält sich vergleichbar mit der Gesamtmenge an PKC (s.o.).

Die relative Phosphorylierung von Threonin172 in der AMPK bezogen auf die Gesamtexpression in den Proben zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in den betrachteten Muskeln (siehe Abb. 3.2.8).

Intermuskulär zeigte sich ein muskelspezifisches Muster der Phosphorylierung. In allen Gruppen bestand eine erhöhte Phosphorylierung im M. *tibialis ant.* Diese lag in der dB+-Gruppe mit *IR* bei 137% über dem Durchschnitt der anderen Muskeln (verglichen mit M. *soleus* $p=0,0081$). Die Phosphorylierung im M. *gastrocnemius* zeigte sich teilweise reduziert. In der dB+-Gruppe mit *IR* betrug diese Reduktion 66% verglichen mit dem Durchschnitt der anderen Muskeln, wies aber lediglich im Vergleich zum M. *soleus* eine Signifikanz auf ($p=0,0008$). Da diese Verhältnisse in allen Gruppen annähernd konstant bleiben, zeigt sich kein Anhalt für eine Variation innerhalb der Variablen des Experimentes.

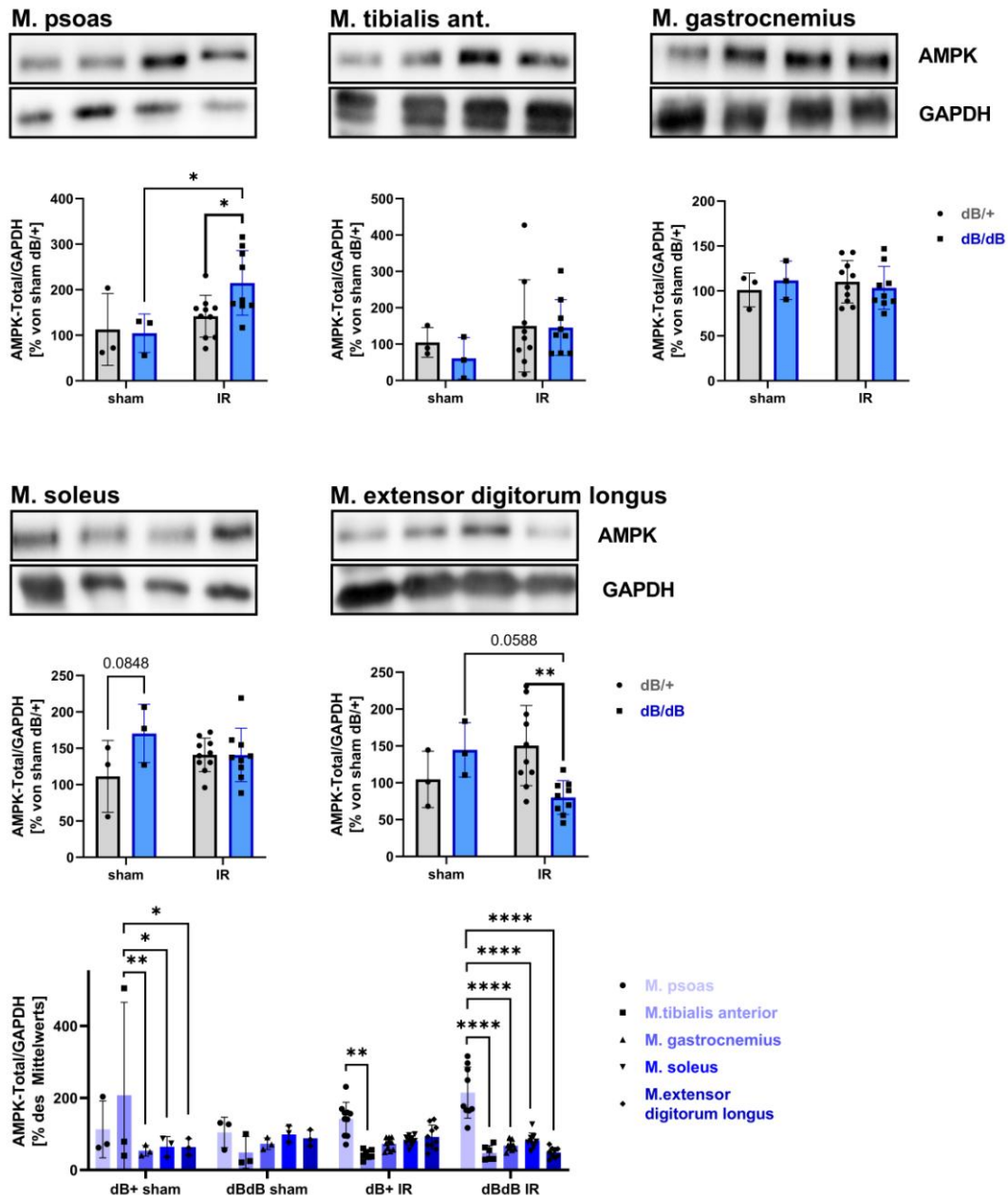


Abb. 3.2.7 Betrachtung der Adenosin-Monophosphat-abhängigen Kinase (AMPK)-Konzentration Skelettmuskelzellen. Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der Bande in der Immunfärbung von AMPK normiert auf die Intensität der Bande der Ladekontrolle Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nach *Western Blot*. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiell Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie Reperfusionstherapie (IR) andere lediglich eine -Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent des arithmetischen Mittelwerts in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balken symbolisieren das 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarzen Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0.05$, ** entspricht $P \leq 0.01$, *** entspricht $P \leq 0.001$, **** entspricht $P \leq 0.0001$. Dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Musculus gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (M. extensor digitorum longus). Oberhalb der Balkendiagramme sind exemplarische Fotografien der Immunfärbungen aus den jeweiligen Proben dargestellt. Die Auftragung entspricht hierbei der x-Achse des Balkendiagramms. Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der AMPK-Bande normiert auf die Intensität der GAPDH-Bande der jeweiligen Proben. Hier erfolgte die Auftragung in Prozent des Mittelwerts in der Probe von dB+ sham im M. psoas zu intermuskulärem Vergleich

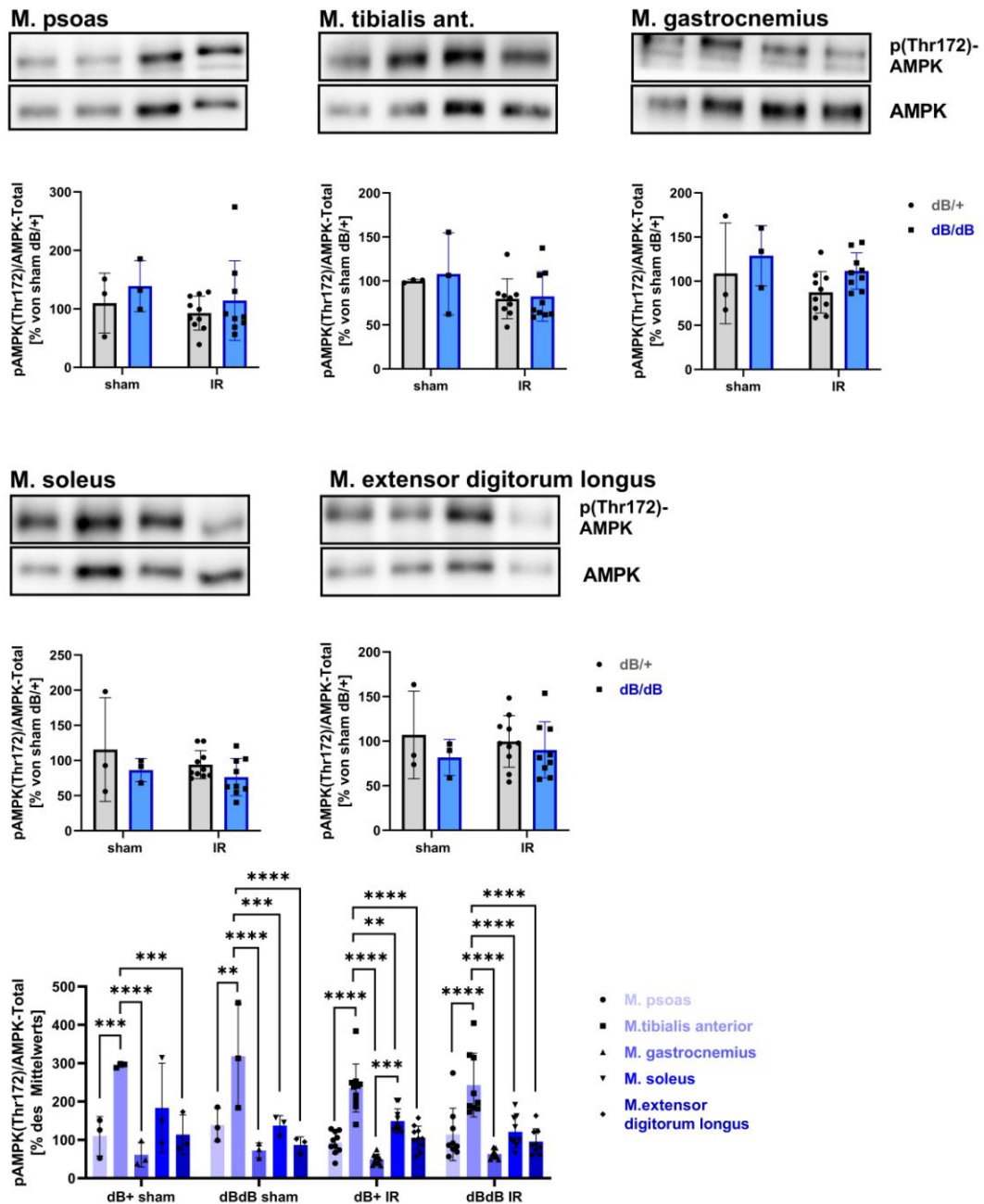


Abb. 3.2.8 Betrachtung der Adenosin-Monophosphat-abhängigen Kinase (AMPK)-Phosphorylierung a Threonin 172 (p(Thr172)AMPK) in Skelettmuskelzellen. Oben: Die Balkendiagramme zeigen die Intensität der Bande in der Immunfärbung von p(Thr172)AMPK normiert auf die Intensität der Bande der AMPK nach *Western Blot*. Verglichen wurden Faserproben aus Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Von diesen wiederum erhielten einige eine mechanisch herbeigeführte myokardiale Ischämie-Reperfusionstherapie (IR) andere lediglich eine *Sham*-Operation ohne Ischämieinduktion (sham). Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen werden in Prozent des arithmetischen Mittelwerts in der Referenzgruppe dB+ sham angegeben. Die vertikalen Balken symbolisieren das 95%-Konfidenzintervall für den tatsächlichen Mittelwert in der Gruppe. Die schwarzen Punkte und Quadrate repräsentieren die Einzelergebnisse der betrachteten Proben. Die Bezugslinien zeigen die P-Werte der statistischen Analyse, entsprechend der Wahrscheinlichkeit, dass die gemessene Differenz tatsächlich nur auf Streuungen innerhalb einer homogenen Grundgesamtheit zurückzuführen ist. * entspricht $P \leq 0,05$, ** entspricht $P \leq 0,01$, *** entspricht $P \leq 0,001$, **** entspricht $P \leq 0,0001$. Dargestellt sind die Ergebnisse für den Musculus psoas (M. psoas), Musculus tibialis anterior (M. tibialis anterior), Musculus gastrocnemius (M. gastrocnemius), Musculus soleus (M. soleus) und Musculus extensor digitorum longus (M. extensor digitorum longus). Oberhalb der Balkendiagramme sind exemplarisch Fotografien der Immunfärbungen aus den jeweiligen Probensätzen dargestellt. Die Auftragung entspricht hierbei der x-Achse des Balkendiagramms. Unten: Verglichen wird ebenfalls die Intensität der p(Thr172)AMPK-Bande normiert auf die Intensität der AMPK-Bande der jeweiligen Proben. Hier erfolgte der Vergleich in Prozent des Mittelwerts in der Probe von dB+ sham im M. psoas zum intermuskulären Vergleich.

4 Diskussion

4.1 Methodische Validität

4.1.1 Koronargefäßligation als Modell für den Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz

Die Koronargefäßligation beim Tier ist ein etabliertes Modell zur Induktion einer Herzinsuffizienz (441). Da ein echter Myokardinfarkt induziert wird, ist davon auszugehen, dass dieser stellvertretend für einen thrombotisch-okklusiven Infarkt stehen kann. Es ist jedoch bekannt, dass das Ausmaß der Infarktgröße und damit die Intensität der Infarkt-typischen Veränderungen je nach Tier und Eingriff schwankt (442, 443). Dies könnte erklären, warum sich in der *IR* Gruppe dieser Arbeit viele Tiere in der mechanischen Messung signifikant unterschiedlich von der *sham*-Gruppe zeigten, einige jedoch vergleichbar mit der *sham*-Gruppe und deutlich unterschiedlich von der *IR*-Gruppe verhielten. Allerdings verhielten sich diese Tiere nicht in allen Experimenten einheitlich, deshalb kann ein kausaler Zusammenhang nicht bewiesen werden. Womöglich werden unterschiedliche Signalwege im Skelettmuskel erst bei einer gewissen Infarktgröße bzw. Signalstoffkonzentration rekrutiert, sodass je nach Erfolg der Infarzierung ein differenziertes Muster in der Regulation entsteht.

Zudem ist bekannt, dass die Tiere nach *IR* Veränderungen entwickeln, die einer Herzinsuffizienz ähnlich sind (444). Da der Myokardinfarkt auch beim Menschen eine häufige Ursache für die Herzinsuffizienz ist (1), ist anzunehmen, dass das Modell diese Art des Infarktes besonders gut darstellt. Eine zeitliche Limitation des Modelles ist jedoch durch die Regenerationsfähigkeit der Tiere gegeben. Da die Tiere, abgesehen vom Genotyp und des *IR* gesund sind, greifen Kompensationsmechanismen, die die Herzinsuffizienz zunehmend verringern können (444). Dieser Effekt wurde aber erst einige Wochen nach *IR* beobachtet (444), sodass im Rahmen der frühen Betrachtung in dieser Arbeit eine gute Modellfunktion angenommen werden kann.

4.1.2 Leptin-Rezeptor-Defizienz als Diabetesmodell

Auch die Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB) ist ein etabliertes und verbreitetes Modell für eine diabetische Stoffwechsellege (428, 429). Grundlage des Modelles ist, dass die Tiere keinen Rb-Leptinrezeptor bilden können (445, 446). Dieser induziert im Hypothalamus das Sättigungsgefühl. Der kürzere Ra-Leptinrezeptor, der in vielen Geweben exprimiert wird, bleibt weiterhin funktionsfähig (447) (siehe Abb. 4.1.1).

In der Folge sind die Tiere hyperphagisch, haben erhöhte Leptinspiegel, sind hyperglykämisch, hyperinsulinäm, insulinresistent und übergewichtig (448–451).

Auch bei Diabetikern ist der Leptinspiegel erhöht, jedoch nicht in einem so drastischen Ausmaß wie bei dBdB (452–454). Da Leptin womöglich ein

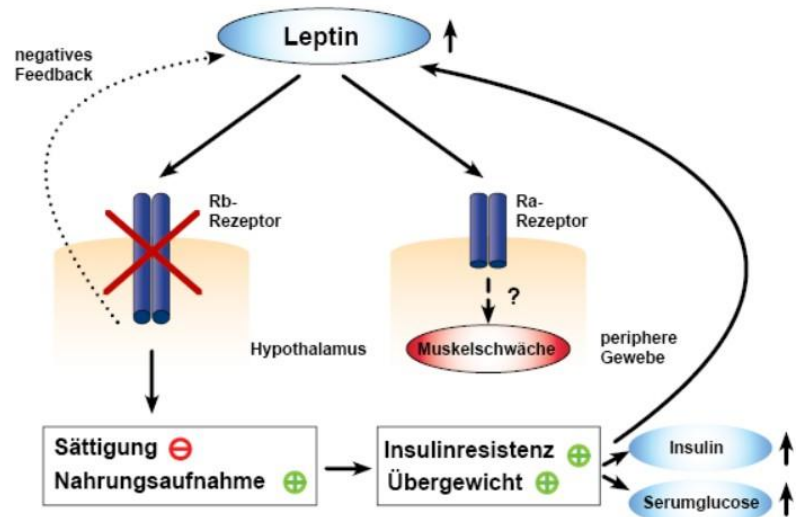


Abb. 4.1.1 Das Rb-Leptinrezeptor-Defizienz-Modell. Bei einer Defizienz des Rb-Leptin-Rezeptors (Rb-Rezeptor) kommt es zu einem Aussetzen der spezifischen Leptinwirkung am Hypothalamus. Dies bewirkt unter anderem das Aussetzen eines negativen Feedbacks, sodass es zu einer gesteigerten Leptinkonzentration kommt. Zudem kommt es zu einem verminderten Sättigungsgefühl und einer gesteigerten Nahrungsaufnahme. Dies führt sekundär zu einer Insulinresistenz und einem Übergewicht, was wiederum zu erhöhten Insulin- und Serumglucosespiegeln führt. Der Ra-Leptinrezeptor (Ra-Rezeptor) bleibt bei der Mutation intakt. Er kommt an peripheren Geweben vor und seine Funktion im Rahmen des Modells ist unklar.

entscheidender Signalstoff im Zusammenhang mit der Sarkopenie bei Herzinsuffizienz ist, und die Gewebewirkung über den Ra-Rezeptor weiterhin funktional ist, könnten also hier bei dBdB beobachtete Effekte ausgeprägter sein, als bei Menschen mit Diabetes. Erwähnenswert ist außerdem, dass auch die dB+ Tiere verglichen mit gesunden einen erhöhten Leptinspiegel aufweisen (454).

Auch die Hyperglykämien sind ausgeprägter als beim menschlichen Diabetes (455). Zudem setzen diese metabolischen Veränderungen bereits in einem jungen Alter ein. Dies deckt sich also nicht mit dem Krankheitsverlauf des Typ II Diabetes, der erst in höherem Alter ausgeprägt wird. Sie zeigen zudem eine beschleunigte Gluconeogenese und einen beschleunigten Glykogenstoffwechsel (456). Die Insulinresistenz ist jedoch nicht direkt auf eine Veränderung der Aktivität des Insulinrezeptors in der Muskelzelle zurückzuführen (457).

Zudem zeigen die dBdB-Tiere ein anderes kardiovaskuläres Risikoprofil als menschliche Diabetiker. Sie zeigen ein vermindertes Herzzeitvolumen mit verringertem Blutdruck (458). Zudem ist bei dBdB vornehmlich das *high density lipoprotein* (HDL)-Cholesterin erhöht, weshalb der arteriosklerotische Habitus ebenfalls nicht sicher vergleichbar ist (459).

Dennoch finden sich insgesamt viele parallelen im Phenotyp zwischen einem typischen Typ-2 Diabetes Patienten und einer dBdB-Maus. Wie Wang et al. bereits bemerkten, handelt es sich aber trotz aller Stärken lediglich um ein monogenetisches Modell für ein komplexes multigenetisches Krankheitsbild (428).

4.1.3 Biomechanische Messungen

Die experimentelle Methode der Einzelfaserkraftmessung ist ebenfalls ein etabliertes Verfahren. Da die Fasern manuell vom Untersucher präpariert werden, bietet dies einen gewissen Spielraum für Fehler. Bei der Präparation sind möglichst dünne Fasern wünschenswert, da bei diesen der Anteil der extrazellulären Matrix geringer ist und eine im Verhältnis zum Volumen größere Oberfläche der Badelösung ausgesetzt wird. Weil aber das Muskelgewebe der dBdB-Tiere bereits hier auffällig anders strukturiert ist, als das der dB+-Tiere, kann Ersteres nicht so fein präpariert werden wie letzteres Gewebe. Um daher einen systematischen Fehler zu vermeiden, wurde hier ein angestrebter Präparationsdurchmesser gewählt, der für beide Genotypen zu erreichen war. Zusätzlich wurde die erhobene Kraft auf die Querschnittsfläche der Faser bezogen und es wurden jeweils vier Fasern pro Gewebeprobe analysiert und dann mit den Durchschnittswerten gerechnet, was beides dazu diente, die Daten vergleichbarer zu machen.

Die gemessenen passiven Kraftunterschiede sind vermutlich größtenteils durch Veränderungen am Titin zu erklären. Es ist bekannt, dass die passive Steifigkeit von Muskelzellen wesentlich durch Titin- und Kollagenfilamente bestimmt wird (7, 8).

Da Kollagene hauptsächlich in der extrazellulären Matrix vorkommen (460) und extrazelluläres Gewebe bei der Präparation weitgehend entfernt wurde, ist deren Anteil an der passiven Muskelmechanik voraussichtlich reduziert. Zudem erfolgte eine erste Dehnungsreihe der Fasern noch bevor die Messergebnisse erhoben wurden. Ab der zweiten Messung waren die generierten passiven Kräfte deutlich geringer als bei der ersten und deren Zusammenhang mit der Dehnung eher quadratisch als linear. Diese Veränderungen im Kraftprofil sprechen dafür, dass nicht elastische, eine passive Kraft vermittelnde Strukturelemente bei der ersten Messung zerstört oder ausgerissen wurden. Dies könnte insbesondere starre Kollagenstrukturen betreffen, wobei aber auch elastische Kollagenformen im Skelettmuskel bekannt sind (461). Wie groß der Einfluss elastischer Kollagene auf die passive Steifigkeit eines Muskels ist, hängt unter anderem vom Muskel selbst ab (7) und könnten die Daten insofern beeinflussen.

Titin ist der entscheidende Bestandteil für die passive Steifigkeit des Sarkomers (5–7). Da dieses im Skelettmuskel die mechanisch bedeutendste intrazelluläre Struktur darstellt, ist es also von großer Bedeutung für die passiven mechanischen Eigenschaften einer Muskelzelle. Da bei der gewählten Präparationsmethode vor allem intrazelluläres Material erhalten bleibt, ist davon auszugehen, dass ein wesentlicher Teil der erhobenen Kräfte direkt auf Titin zurückzuführen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Messungen der aktiven Muskelkraft durchgeführt. Grundlage ist, dass die chemisch gehäuteten bzw. membranperforierten Fasern einer Badelösung mit erhöhtem Calciumgehalt ausgesetzt werden. Dies führt bekannterweise zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration, was auf physiologischem Wege zu einer Muskelkontraktion führt (462–464). Allerdings sind diese Kontraktionen nur bedingt stellvertretend für jene, die physiologischerweise durch Nervenzellen ausgelöst werden. Unter experimentellen Bedingungen kommt es zu einem gleichmäßigen über Sekunden bestehenden Calciumeinstrom. Dies entspricht nicht den physiologischen Bedingungen, bei denen es als Antwort auf Aktionspotentiale zu einem kurzen Einstrom bzw. bei tetanischer Kontraktion zu einer Salve kurzer Einströme kommt (465). Der artifizielle Einstrom stört den zellulären Calciumhaushalt und wurde mit einer dystrophen Wirkung auf die Muskulatur in Verbindung gebracht (462, 463, 466).

Dies deckt sich mit dem in dieser Arbeit erhobenen Befund, dass nach den aktiven Messungen die maximale aktive Kraft etwas geringer war als die erste maximale aktive Kraft. Da dieser Unterschied jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant war, ist davon auszugehen, dass die Messungen in einem relativ stabilen Zustand stattgefunden haben.

Es ist zudem bekannt, dass die Calciumsensitivität von Muskelzellen von der Temperatur abhängig ist (467). Alle hier durchgeführten Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und neu eingefüllte Badelösungen wurden erst nach einer Wartezeit zur Temperaturangleichung verwendet.

Das gewählte Muskelaktivierungsmuster im Versuchsaufbau war nur begrenzt physiologisch. Da jedoch nicht der transduktive Mechanismus, sondern lediglich die Endstrecke dessen, nämlich die Sarkomerfunktion, betrachtet werden sollte, und dies zwar unter unphysiologischen, aber immer vergleichbaren Bedingungen geschah, ist davon auszugehen, dass beobachtete Veränderungen am Sarkomer denen im lebenden Organismus nahekommen.

Einer eventuellen Überlagerung der aktiven Kräfte durch passive Muskelkräfte durch die Einspannung in die Versuchsanordnung wurde begegnet, indem die Ausgangskraft vor Muskelaktivierung von den gemessenen Kräften abgezogen wurde. Da die angestrebten 20% Vordehnung bezogen auf die Faserlänge hier unter optischer Kontrolle erfolgte, war diese vermutlich subjektiv variabel. Auch diesem Effekt, wirkt die Durchschnittsbildung von vier Fasermessungen pro Gewebe entgegen.

4.1.4 Biochemische Messungen

Bei den verwendeten Methoden zur biochemischen Untersuchung der Proben handelt es sich um verbreitete und gut etablierte Verfahren, die jedoch für die Darstellung von Titin einigen Modifikationen unterzogen werden mussten.

Die erste Besonderheit stellt die manuelle Probenpräparation mittels Skalpell dar. Es ist schon lange bekannt, dass das Titinprotein empfindlich ist und leicht bei der Präparation degradiert (468). Daher hat sich das gewählte Verfahren gegenüber anderen normierbarer Verfahren in der Arbeitsgruppe bewährt. Es hat jedoch den Nachteil, dass die Präparation allein unter subjektiver optischer Kontrolle erfolgt und daher vermeintlich in ihrer Qualität schwankt. Es wurde schon in anderen Kontexten beobachtet, dass das Präparationsverfahren einen Einfluss auf die Ergebnisse nimmt (469). Da jedoch hier das Verfahren auf alle Proben angewendet wurde, ist anzunehmen, dass sich der eventuelle Fehler in der Präparationsqualität gleichmäßig auf alle Proben verteilt und die Schärfe der Ergebnisse reduziert, jedoch keinen systematischen probenabhängigen Fehlerfaktor in die Daten trägt. Beobachtete Signifikanzen hingegen bestanden trotz dieser Variation und sind vor diesem Hintergrund als zuverlässig zu betrachten.

Ein weiterer wesentlicher Einflussfaktor auf die Ergebnisqualität ist die Probenbeladung, also die eingesetzte Proteinbeladung pro Probe. Denn nur wenn die Banden sich deutlich darstellen, aber nicht überladen sind, ist ein linearer Zusammenhang zwischen Bandenintensität und Proteinmenge anzunehmen (470). Da jedoch die Blots, die der Untersuchung von PKC und AMPK dienen, gemeinsam mit GAPDH dargestellt werden sollte, das bei gleicher Beladung eine deutlich höhere Intensität hervorbrachte, musste für die Beladung ein Kompromiss gefunden werden. Zu diesem Zweck wurden vor der Untersuchung der in dieser Arbeit verwendeten Proben Verdünnungsreihen mit

unterschiedlichen Proteinkonzentrationen betrachtet und darauf aufbauend die bestmögliche Beladung gewählt. Da bei diesem Beladungsmuster jedoch GAPDH tendenziell eher stark zur Darstellung kam, könnte es sein, dass bei einzelnen Proben die Auflösung der Kontrolle limitiert ist (471). Limitiert wird dieser Fehler jedoch dadurch, dass viele Blots mehrfach durchgeführt wurden und zumindest in den *IR* Proben eine höhere Anzahl an Versuchstieren vorlag. Zudem liegt die gewählte eingesetzte Proteinmenge in der Spanne, die für die quantitative Untersuchung empfohlen wird (472, 473). Es ist bekannt, dass die Stabilität mehrerer Ladekontrollen gegenüber einer einzelnen erhöht ist (469). Zudem werde zunehmend auch Gesamtprotein-Färbungen als Ladekontrolle empfohlen (474, 475). Die verwendete Normierung auf GAPDH als Ladekontrolle ist jedoch weiterhin verbreitet. Die geringste Abweichung bei Ladekontrollen ist zu erwarten, wenn sie direkt auf der gleichen Membran in der gleichen Bande wie die untersuchte Probestructur angefärbt werden, was hier geschehen ist.

Nächster relevanter Punkt ist die Auswahl und Qualität der verwendeten Antikörper. Die Spezifität der Antikörper wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit validiert. Es sind jedoch verbreitete Antikörper, zu denen bereits viele Vorbefunde vorlagen und mit denen die Arbeitsgruppe gute Erfahrungen gemacht hat. Problematisch zeigte sich jedoch die Verwendbarkeit der Titinbezogenen Antikörper. Eine geplante Unterschung der Phosphorylierung von Titin an Serin 11878 konnte aufgrund einer schlechten Antikörperqualität daher leider nicht durchgeführt werden. Die Konzentration der Antikörper wurde vor der Betrachtung der eigentlichen Proben ebenfalls in einer Verdünnungsreihe betrachtet. Die so ermittelte Antikörperkonzentration wurde dann über alle Experimente beibehalten und immer gleichermaßen mit 2% BSA blockiert. So konnten voraussichtlich auch hier systematische Fehler vermieden werden.

Eine Limitation der Daten stellt die sequenzielle Betrachtung von Phosphoprotein- und Gesamtproteinantikörpern dar. Hier wurden immer zunächst die Phosphoproteinantikörper betrachtet und dann nach dem oben beschriebenen *Stripping* der Gesamtproteinantikörper. Da es bei diesem Prozess tendenziell zum Verlust von Zielprotein kommen kann, könnte es sein, dass insgesamt weniger Protein bei der Gesamtproteinfärbung zur Verfügung stand. Folge wäre dann eine überschätzte Phosphorylierung. Da allerdings nicht die Gesamtphosphorylierung sondern nur relative Veränderungen dieser unter den experimentellen Parametern betrachtet wurden, wäre dieser Effekt, weil er voraussichtlich alle Proben im gleichen Maße betrifft, nicht nennenswert störend. Eine weitere Limitation des *Strippings* stellt jedoch die Beobachtung dar, dass es bei unterschiedlichen Antikörpern unterschiedlich effektiv wirkt (469). Dies ist aber ebenfalls bei dem Vergleich relativer Werte kein nennenswertes Problem, da immer nur Verhältnisse gleichartiger Antikörper verglichen wurden, auf die die Wirkung des *Strippings* daher vergleichbar sein sollte.

Letzter zu thematisierender Aspekt sind eventuelle Störgrößen bei der Auswertung. Durch eine subjektive Auswahl an Färbungen, die einfließen sollen, wäre ein systematischer Fehler denkbar. Daher wurden für diese Arbeit alle erstellten Blots mit klarer Antikörperbindung verwendet. Die Elimination von Daten erfolgte mathematisch über einen *Outlier*-Test und nur manuell, wenn diese klar unplausibel waren. Die Korrektur des Hintergrunds erfolgte ebenfalls nicht manuell, sondern über die integrierte lokale Subtraktion der Auswertungssoftware *ImageLab*.

4.2 Einordnung der Ergebnisse

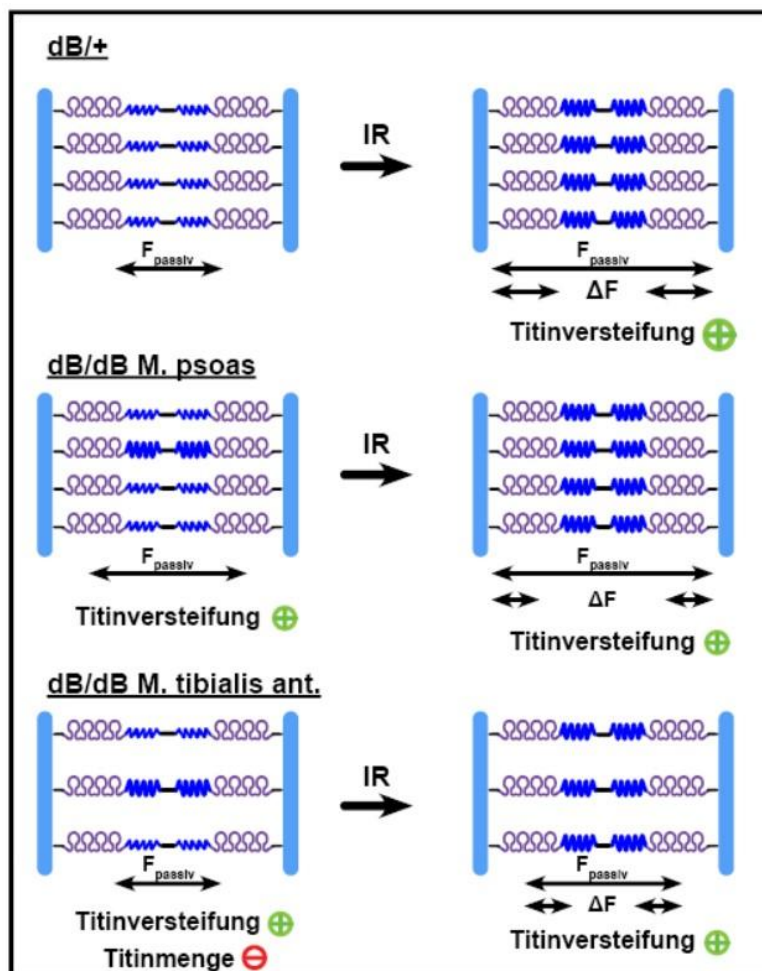
4.2.1 Passive Kraft

Wie in der methodischen Diskussion herausgearbeitet wurde, sind die hier erhobenen Befunde vermeintlich vornehmlich auf das Titinprotein zurückzuführen. Da Titin direkte Zielstruktur verschiedener regulativer Mechanismen ist, lässt sich vermuten, dass Modifikationen direkt an Titin für einen wesentlichen Teil der veränderten Mechanik verantwortlich sind.

Unterstrichen wird die Bedeutung der Sarkomerversteifung dadurch, dass sie besteht, obwohl gleichzeitig der Befund erhoben werden konnte, dass die Gesamt-Titinmenge reduziert ist. Dies würde eher eine geringere passive Muskelkraft erwarten lassen. Da sie dennoch gesteigert ist, wird dieser Effekt hier mehr als ausgeglichen, woran vermeintlich eine Versteifung des noch vorhandenen Titins beteiligt ist.

Bei Diabetes mellitus ist ebenfalls die passive Kraft nach IR signifikant erhöht, jedoch fällt der relative Steigerungseffekt der passiven Kraft nach IR geringer aus als bei dB+. Dies äußerte sich im M. tibialis ant. in einer geringeren erreichten passiven Kraft und im M. psoas in einer höheren passiven Kraft in der dBdB-Sham-Gruppe als in der dB+-Sham-Gruppe.

Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass in der dBdB-Gruppe gegenüber dB+ die Titinmenge im Skelettmuskel insgesamt reduziert ist. So könnte der Versteifungseffekt weniger effektiv wirksam sein, passend zu den biomechanischen Befunden im M. tibialis anterior. Alternativ könnte Titin bereits vorher in einem gegenüber dB+ vermehrt versteiften Zustand vorliegen, korrespondierend mit den Befunden im M. psoas. In letzterem Fall wäre dann ebenfalls die relative Steigerbarkeit der Titinsteifigkeit limitiert (siehe Abb. 4.2.1).



Die mögliche vermehrte Titinversteifung bei einem Diabetes mellitus würde gut mit der Literatur korrespondieren. Am Herzen ist bei Diabetes mellitus eine Titinversteifung beobachtet worden (424). Mechanische Messungen von Muskelproben herzgesunder Diabetiker zeigten einen reduzierten Titingehalt bei erhöhter passiver Steifigkeit, auch wenn hier die Autoren, die Differenz am ehesten auf eine steifere extrazelluläre Matrix zurückführten (476).

Die Regulation, die zu einer derartig erhöhten passiven Kraft durch Titin im Modell führt, ist bislang unklar. Es gibt wie in vorherigen Kapiteln beschrieben verschiedene Modifikationswege, die zu Veränderungen der Titinmechanik führen können. Denkbar sind eine veränderte Isoformenexpression oder

Abb. 4.2.1 Schematische Darstellung des möglichen Zusammenhangs der Titinmodifikation und passiver Kraft in der biomechanischen Messung. Schematisch zeigt sich eine Darstellung von Titin, das über das Sarkomer spannt (Abstand der beiden vertikalen Balken) mit seinen Immunglobuline-like-Domänen (violette Schleifen) und der elastischen Prolin-, Glutamin-, Valin- und Lysinreiche PEVK-Region (blaue Federn). Verglichen wurden Fasern von Mäusen mit einer genotypisch partiellen Leptin-Rezeptor-Defizienz (dB+) mit denen von Mäusen mit einer kompletten Leptin-Rezeptor-Defizienz (dBdB). Sowie die Veränderungen bei einer mechanisch herbeigeführten myokardialen Ischämie-Reperusionsbehandlung (IR). Bei dB+ gibt es eine gewisse passive Ausgangskraft (F_{passiv}). Diese steigert sich nach IR deutlich, durch eine Titinversteifung (dargestellt durch vergrößerte Federn) wodurch sich nach IR eine große Kraftdifferenz (ΔF) ergibt. Darunter werden Veränderungen im Musculus psoas (M. psoas) und Musculus tibialis anterior (M. tibialis ant.) bei dBdB-Tieren verglichen. Im M. psoas liegt hier bereits eine vermehrte Titinversteifung vor, sodass hier F_{passiv} größer ist, als bei dB+. Nach IR kommt es auch hier zu einer vermehrten Titinversteifung und einem erhöhten F_{passiv} , jedoch ergibt sich aufgrund der höheren Ausgangswerte ein geringeres ΔF . Im M. tibialis ant. liegt bei dBdB einerseits eine erhöhte Titinversteifung vor, gleichzeitig jedoch eine reduzierte Titinmenge. Sodass F_{passiv} mit der in dB+ vergleichbar ist. Nach IR kommt es auch hier zu einer Titinversteifung und Steigerung von F_{passiv} , jedoch ergibt sich bei reduzierter Menge und bereits vorbestehender Versteifung eine nur geringere Steigerung von F_{passiv} bei verglichen mit dB+ verringertem ΔF .

posttranslationale Modifikationen.

Veränderungen der Titinisoformenexpression können zwar dessen Mechanik wesentlich beeinflussen, sind aber im Rahmen dieser Arbeit als kausaler Mechanismus unwahrscheinlich, da in den meisten Muskeln, nur eine einzige Titinisoform anzutreffen ist (7). Eine Ausnahme bildet der *M. psoas*, der gemischte Titinisoformen aufweist (7). Auch wenn diese Befunde aus einem physiologischen Kontext stammen, kann man annehmen, dass zumindest unter physiologischen Bedingungen keine dynamische Regulation innerhalb der in einem Muskel exprimierten Titinisoformen vorliegen. Im Falle einer Regulation wären während eines Umbaus verschiedene Titinisoformen gleichzeitig zu erwarten, was bei den hier erhobenen Befunden nicht der Fall war.

Aufgrund der schnellen Möglichkeit ihrer Regulation scheint posttranslationalen Modifikationen an Titin eine entscheidende Rolle zuzukommen. Zudem ist eine Vielzahl von Signalwegen bekannt, die derartige Modifikationen veranlassen und in der Einleitung ausführlich besprochen werden.

Bei der Regulation durch Proteinphosphorylierung ist die PEVK-Region vor den Ergebnissen dieser Arbeit eine vielversprechende Stellschraube. Denn der Verlauf der passiven Kraftkurve zeigt nicht etwa, dass sich die gleiche passive Kraft nach *IR* bereits bei geringerer Dehnung einstellt, sondern eher, dass bei gleicher Dehnung eine deutlich höhere Kraft erreicht wird. Erstere Veränderung würde für eine Titinverkürzung bzw. eine verminderte Verlängerbarkeit der mit geringer Kraftgenerierung ausdehnbaren Ig-Domänen sprechen. Die beobachtete Veränderung spricht aber für die Rekrutierung passive Kraft vermittelnder Strukturen im gleichen zeitlichen Rahmen bei deutlich gesteigerter Kraftantwort. Da die PEVK-Region nach der segmentalen Extensionstheorie hierbei entscheidend ist, wären insbesondere hier Modifikationen eine einleuchtende Erklärung für die Befunde.

Eine Erhöhung der Phosphorylierung und Aktivierung der PKC α wie er bereits am Herzen bei Herzinsuffizienz vorbeschrieben ist (14, 15), konnten wir in der vorliegenden Arbeit am Skelettmuskel nicht nachweisen. Auch wenn die PKC α -Expression nach *IR* teilweise erhöht schien, erreichte dies in diesem Datensatz keine statistische Signifikanz. Die betrachtete aktivierende Phosphorylierungsstelle an der PKC α zeigte sich jedoch in mehreren Muskeln signifikant reduziert. In einer funktionellen Betrachtung kam es nie zu einer signifikanten Veränderungen in der betrachteten Phosphorylierungsstelle an Serin 12022 von Titin, die eine Zielstruktur der PKC α darstellt. Da jedoch die Befunde in der Biomechanik eindeutig für biochemische Modifikationen an Titin sprechen, ist ein Einfluss anderer Mechanismen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, wahrscheinlich. Da auch die CaMKII, die auf Grundlage der vorbestehenden Literatur ebenfalls ein vielversprechender Kandidat für die Vermittlung der Kraftsteigerung wäre, Serin 12022 modifiziert (356, 357), kann deren Bedeutung auf Grundlage dieser Daten nicht untermauert werden. Auch wenn es also am Skelettmuskel zu mechanischen Veränderungen von Titin analog zu den Beobachtungen am Herzen kam (14, 396, 398, 399) bei denen es zu einer gesteigerten Titinversteifung kommt, scheinen andere Mechanismen vorrangig zu sein, zumindest in dem hier betrachteten sehr frühen Zeitfenster nach *IR*.

Mutmaßen ließe sich eine besondere Bedeutung von titinbindenden Proteinen im Zusammenhang mit einer zellulären Stressantwort. Bekannt ist eine Bindung von Hsp27 gemeinsam mit α B-Cristallin und von Hsp90 an Titin im Rahmen der Zellulären Antwort auf oxidativen Stress (264, 265). Da dieser Zellstress im Rahmen der Herzerkrankung im Skelettmuskel bekanntermaßen erhöht ist (71, 171, 257), ist dieser Mechanismus durchaus plausibel. Es ist bekannt, dass eine solche Interaktion die Steifigkeit des Titinproteins erhöhen kann (263, 264). Einer der sarkomerstabilisierenden Interaktionspartner von Titin ist MuRF1. Da dieser Komplex eine wesentliche Rolle für die Induktion von Apoptose, die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems und die Reduktion der Proteinsynthese in Rahmen der Skelettmuskelatrophie bei Herzinsuffizienz (33) spielt, könnte die biomechanische Beobachtung einer vermehrten Titinsteifigkeit auch Ausdruck einer vermehrten Titin-MuRF1-Interaktion sein und eine ursächliche Beteiligung an der Atrophie haben.

Ein weiterer Prozess, der im Rahmen der Herzinsuffizienz beobachtet wurde, ist die Verschiebung von langsamen-oxidativen hin zu schnellen-glykolytischen Fasern im Skelettmuskel (212–214). Letztere weisen einen geringeren Titingehalt auf (242, 243), was sich mit den biochemischen Befunden in dieser Arbeit deckt. Daher könnte eine Veränderung der Fasertypenexpression die mechanischen

Beobachtungen erklären. Es ist gleichzeitig eine geringere titinabhängige passive Steifigkeit für die langsamen-oxidativen Fasern beschrieben, was mit einem erhöhten Anteil an schnellen-oxidativen Fasern nach *IR* vor den mechanischen Befunden dieser Arbeit korrespondieren würde (7). Mit den Befunden korrespondiert zudem die Beobachtung, dass schnelle Fasertypen kürzere Titinisoformen exprimieren (7, 338). Auch wenn diese also unter physiologischen Bedingungen weniger passive Kraft vermitteln, könnten diese kurzen Titinisoformen bei pathologisch-induzierter Modifikation eine erhöhte passive Kraft erklären.

In einem Modell, indem eine Muskelentlastung einen Wechsel von langsam, oxidativen zu schnellen, glykolytischen Fasern bei Ratten induzieren sollte, fand sich bereits nach vier Tagen eine Koexpression von Myosinisoformen im Sinne von Hybridfasern (477). Nach sieben Tagen zeigte sich die Tendenz der Expression für schnelle, glykolytische Fasern typischer Myosinisoformen weiter fortgeschritten (477). Würde also die *IR* Behandlung im hiesigen Modell ebenfalls einen Fasertypenwechsel induzieren, wäre zeitlich plausibel, dass dieser im gewählten frühen Betrachtungsfenster bereits wirksam ist.

Vor diesem Hintergrund widersprechen Veränderungen der Titinisoformen bei homogenen Expressionsmustern in der biochemischen Analyse sowohl bei dB+- als auch bei dBdB-Tieren in dieser Arbeit einer dynamischen Veränderung der Expression. Allerdings handelt es sich bei der Betrachtung der Titin-Isoformenexpression nicht um eine Referenzgröße in der Fasertypisierung, die dabei womöglich einer immunhistochemischen oder mRNA-basierten Fasertypisierung unterlegen sein könnte.

Im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit bemühten wir uns vor diesem Hintergrund um eine transkriptomische Analyse der Muskelfaserzusammensetzung der verwendeten Muskelproben. Leider lagen als Grundlage hierzu lediglich Restfixate für die anderen experimentellen Ansätze vor, aus denen keine ausreichend konzentrierte und reine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) gewonnen werden konnte. Auch ein anderer Ansatz zur Erstellung von Gewebeschnitten mit geplanter anschließender immunhistochemischer Anfärbung der Fasertypen gelang nicht, da ein Feinschnitt mit den vorliegenden Proben nicht erfolgreich möglich war.

Zudem konnte zumindest im Skelettmuskel eine Arginylierung von Titin mit einer Aufrechterhaltung der passiven Muskelkraft in Verbindung gebracht werden (478). Wie die Regulation dieses Mechanismus abläuft ist bisher unbekannt. Sollte jedoch eine Regulation durch extrazelluläre Stimuli möglich sein, wäre dies ebenfalls ein geeigneter Mechanismus, der die erhobenen biomechanischen Befunde erklären könnte.

Insgesamt scheint also zur weiteren Verfolgung der Befunde eine Aufarbeitung des Mechanismus sinnvoll. In diesem Rahmen erscheint insbesondere eine Betrachtung der *Heat shock* Proteine und Chaperone, aber eventuell auch der CamKII sinnvoll. Zudem könnte auch eine gezielte Analyse der postmyokardischämischen skelettmuskulären Fasertypisierung aufschlussreiche Ergebnisse erzielen.

4.2.2 Aktive Kraft

Bei der beobachteten Steigerung der aktiven Kraft nach *IR* handelt es sich auf den ersten Blick um einen kontraintuitiven Befund. Wie in der Einleitung dargelegt wurde, ist eine Muskelschwäche nach *IR* bzw. bei Herzinsuffizienz eine etablierte Pathologie (3). Da diese mit einer verminderten Kraft bei den Betroffenen einhergeht (46), würde man auch im Rahmen dieser Arbeit eine verminderte aktive Kraft der Muskelfasern erwarten. Stattdessen ist die aktive Kraft der Faserbündel zwölf Tage nach *IR* jedoch signifikant gesteigert, was sowohl bei dB+ als auch bei dBdB Tieren mit einer erhöhten Calciumsensitivität im M. psoas und bei dB+ mit einer erhöhten maximalen aktiven Kraft bei Vordehnung einhergeht.

Es scheint sich am ehesten nicht um eine pathologische Aktivierung der physiologischen Muskelhypertrophie zu handeln. Die aktive Kraft zeigt sich hier in einem frühen Untersuchungsfenster als Antwort auf *IR* gesteigert. Vor der Datenlage aus anderen Untersuchungen ist jedoch zu erwarten (3, 84), dass die beobachtete Kraftsteigerung nicht dauerhaft anhält, da in größerem Zeitabstand nach myokardialer Schädigung eine verminderte aktive Kraft in Skelettmuskeln und eine vermehrte

Proteindegradation gemessen wurde. Gegen eine Hypertrophie im Sinne einer gesteigerten Myofilamentdichte spricht auch, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Reduktion sarkomerischen Titins nachgewiesen wurde. Dessen Abbau ist funktional mit dem Abbau anderer sarkomerischer Proteine verknüpft (78, 218, 220–225). Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass Titin abgebaut wird, während Aktin- und Myosinfilamente vermehrt gebildet und in das Sarkomer integriert werden.

Da aber die Titinexpression in der biochemischen Betrachtung auf die Myosinexpression normiert wurde, ist theoretisch denkbar, dass nicht eine verminderte Titinexpression, sondern eine vermehrte Myosinexpression beobachtet wurde. Myosin wurde hier als Ladekontrolle für eine vermeintlich veränderte Expression von Titin verwendet, sodass ein relativer Vergleich der Myosinexpression nicht möglich ist. Dennoch findet Myosin als Ladekontrolle aufgrund seiner stabilen und starken Expression im Muskelgewebe häufig Anwendung. Veränderungen finden sich hier üblicherweise in der Myosin-Schwere-Ketten-Isoformexpression (479), als in der Gesamtexpression. Daher kann eine Stabilität der Ladekontrolle zunächst angenommen werden.

Eine Beteiligung des mTOR-Weges an der Vermittlung einer gesteigerten aktiven Kraft wäre denkbar. Vor dem Hintergrund, dass dieser durch eine Reihe systemischer Signalstoffe, die bei der Herzinsuffizienz eine Rolle spielen, wie Apelin, Angiotensin II und TGF- β und Myostatin reguliert wird, ließe sich eine Beteiligung vermuten. Der mTOR-Signalweg ist für die physiologische Muskelhypertrophie verantwortlich (183), es wurde aber dennoch auch eine vermehrte Aktivität im Rahmen von Muskelatrophien gezeigt (132, 189, 190). Der Mechanismus, über den der mTOR-Weg atrophiefördernd wirkt, ist zwar noch unklar, könnte aber möglicherweise erst mit einer gewissen Latenz einsetzen. Wenn dem so wäre und mTOR im Rahmen der *IR*-Behandlung im Skelettmuskel aktiviert wird, könnte dies den zeitlichen Verlauf begründen, also dass zunächst eine gesteigerte aktive Kraft vorliegt und erst später eine Muskelschwäche einsetzt. Wie oben aufgeführt spricht jedoch gegen eine physiologische Muskelhypertrophie die Verringerung der Titinexpression, sodass mTOR als alleiniger Auslöser der erhöhten aktiven Muskelkraft unwahrscheinlich wirkt.

Denkbar wäre vor diesem Hintergrund zudem eine Beteiligung der calciumabhängigen Signalwege. Diese könnten über die Hemmung der Expression von Ubiquitinligasen eine Hypertrophie fördern (204), während gleichzeitig über die Induktion von Calpacin ein Titinabbau gefördert wird (205, 363, 364). Dies würde sich gut mit dem Befund einer gesteigerten aktiven Muskelkraft nach *IR* sowohl in dB+ als auch in dBdB decken bei im *M. psoas* gleichzeitig erhöhter Calciumsensitivität nach *IR* sowie einer reduzierten Titinexpression nach *IR* im *M. tibialis anterior*. Allerdings sind neben Calpacin auch die Ubiquitinligasen selbst am Abbau von Titin wesentlich beteiligt (226), sodass unklar bleibt, ob allein die Aktivierung von Calpacin eine derart unterschiedliche Wirkung auf Titin und andere Sarkomerproteine zeigt.

Es konnte jedoch zusätzlich eine Beeinträchtigung der Calciumströme im Rahmen der Muskelfunktion beobachtet werden. So zeigte sich bei Ratten 24 Wochen sowie sechs Monate nach *IR* eine deutliche Reduktion der stimulationsabhängigen Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Reticulum über Ryanodin-Rezeptoren (480, 481). In unserem Modell zeigte sich jedoch 12 Tage nach *IR* bei Mäusen sowohl bei dB+ als auch bei dBdB die Calciumsensitivität signifikant gesteigert. Für die Calciumsensitivität ergibt sich also analog zur aktiven Muskelkraft die Vermutung, dass es nach *IR* zu einer vorübergehenden Steigerung mit anschließender Reduktion kommt.

Am Herzen konnte bereits eine Woche nach *IR* eine gesteigerte Expression spannungsgesteuerter Calciumkanäle mit erhöhtem Calciumfluss und im Verlauf eine vermehrte Aktivierung der Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Achse gezeigt werden (482). Dies zog eine myokardiozytäre Hypertrophie mit verschlechterter kontraktile Funktion nach sich. Überträgt man diesen Befund auf den Skelettmuskel könnte die gesteigerte Calciumsensitivität nach *IR* im *M. psoas* in beiden Gruppen Ausdruck einer beginnenden vermehrten Aktivierung der Calcium-Calmodulin-Calcineurin-NFAT-Achse sein und auch hier im Verlauf eine verschlechterte muskuläre Funktion bedingen.

Auch die im Rahmen der passiven Kraft diskutierte Veränderung der Fasertypen in den betrachteten Muskeln nach *IR* könnte die Steigerung der aktiven Kraft erklären. Da schnelle, glykolytische Fasern wie sie vermehrt bei einer Herzinsuffizienz gebildet werden eine höhere maximale aktive Kraft

erzeugen (212, 242, 243), könnte also theoretisch auch diese Veränderung den biomechanischen Befund einer gesteigerten Kraft nach *IR* insbesondere bei dB+ erklären. Dagegen spricht wie bei der passiven Kraft bereits diskutiert vermeintlich die homogene Titin-Isoforme-Expression sowohl bei den dB+ *IR*- als auch bei den dBdB *IR*-Tieren. Bei Betrachtung mit einer längeren Latenz nach einer myokardischämisch bedingten Herzinsuffizienz überwiegt zudem bei anderen Arbeitsgruppen die skelettmuskuläre Muskelschwäche (3), wobei hier bei chronischen Herzinsuffizienzpatienten eine reduzierte aktive Muskelkraft bei reduzierter Muskelmasse und reduzierter muskulärer Ausdauerbelastbarkeit beobachtet wurde. Gleichzeitig wird bei chronischer Herzinsuffizienz ebenfalls ein verglichen mit Gesunden erhöhter Anteil schneller, glykolytischer Fasern beobachtet (212). Wenn also eine dynamische Veränderung der Muskelfasertypen hier eine Rolle spielt, und man vom Fortschreiten einer myokardischämie zu einer ischämisch-bedingten Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz ausgeht, könnte sie nicht als einziger beteiligter Prozess die Befunde zur aktiven Muskelkraft nach Myokardinfarkt erklären. Zusätzlich zu einem Wechsel hin zu schnellen, glykolytischen Fasern müsste die mechanische Qualität dieser Fasern im Verlauf abnehmen oder deren Anzahl reduziert werden.

Auch eine Beeinträchtigung der PKC α -Aktivität könnte die aktive Muskelkraft nach *IR* verändern. Am Herzen konnte bereits in unterschiedlichen Modell gezeigt werden, dass die PKC α die aktive Kraft bei Herzinsuffizienz reduziert (13, 276, 277). In einem Herzinsuffizienzmodell durch eine Myokardischämie und Aortenligatur bei Ratten, zeigte sich nach zwölf Wochen eine unbeeinträchtigte, jedoch nach 32 Wochen eine vermehrte PKC α -Expression und Aktivierung (13). In einem transgenen Mausmodell führte eine myokardiale Überexpression der PKC α zu einer Hypokontraktilität während eine verminderte myokardiale Expression zu einer Hyperkontraktilität in der Einzelzellmessung führte (277). Zudem zeigte sich die kontaktile Dysfunktion bei Herzinsuffizienzinduktion durch eine Aorteligatur bei einer verminderten PKC α -Expression verringert (277). In einem anderen transgenen Mausmodell führte eine artifizielle Aktivierung der PKC α durch eine myokardiale Perfusion mit einem spezifischen Aktivator zu einer biochemisch verminderten Myosin-ATPase-Rate (276).

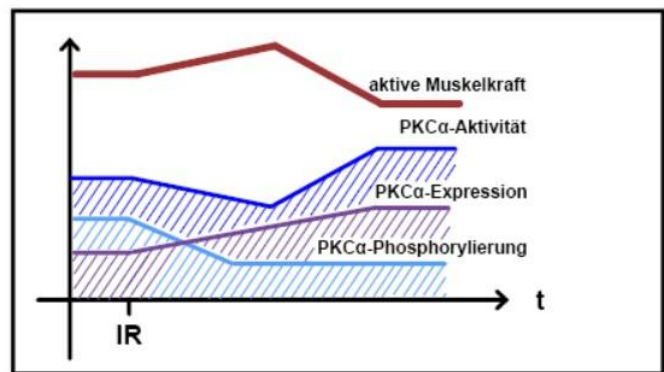


Abb. 4.2.2 Modell der aktiven Skelettmuskelkraft nach myokardialer Ischämieinduktion (IR) in Abhängigkeit von der Proteinkinase C α (PKC α). Schematisch dargestellt sind mögliche Veränderungen nach IR in Abhängigkeit von der Zeit (t). Es kommt zu einer schnellen Verminderung der PKC α -Phosphorylierung bei langsamer Steigerung der PKC α -Expression. Als Summenfunktion dessen ergibt sich PKC α -Aktivität zunächst vermindert und später gesteigert. Die aktive Muskelkraft verhält sich zu dieser antiproportional zu letzterer und ist zunächst gesteigert und im Verlauf herabgesetzt.

Auch am Skelettmuskel konnte im Rahmen dieser Arbeit in einige Muskelgruppen eine vermehrte PKC α -Expression nach *IR* beobachtet werden, ohne dass dies in dem gewählten frühen Beobachtungszeitfenster eine Signifikanz zeigte. Signifikant reduziert war jedoch die PKC α -Phosphorylierung an Serin 660 und damit deren Aktivierung. Überwiegt die Wirksamkeit der verminderten Aktivierung über die vermehrte Expression, so könnte die insgesamt reduzierte Wirkung, sollte sich die Aktivität der PKC α am Skelettmuskel wie am Herzen verhalten (13, 276, 277), zu der beobachteten Kraftsteigerung führen.

In diesem Fall wäre eine Betrachtung der Dynamik sinnvoll. Zwar kommt es im Herzen nach einer *IR*-Behandlung von Mäusen bereits nach einer Stunde zu einer vorrübergehend vermehrten PKC α -Aktivität (34), dennoch ist anzunehmen, dass eine veränderte Phosphorylierung schneller erfolgt, als eine veränderte Expression. Sollte die Expression der PKC α im zeitlichen Verlauf weiter zunehmen, könnte dies die anfänglich verminderte Aktivierung ausgleichen und eventuell sogar im Gegenteil dann zu einer Hemmung der aktiven Muskelkraft führen. Insofern ist also die PKC α eine denkbare

Ursache für den dynamischen Befund, bei dem der Muskelschwäche zunächst eine Kraftsteigerung vorausgeht (siehe Abb. 4.2.2).

Allerdings konnte gezeigt werden, dass in einem transgenen Mausmodell, indem kardiales Troponin durch das schneller, glykolytischer Skelettmuskeln ersetzt wurde, eine künstliche Aktivierung der PKC α eine geringere Kraftreduktion zur Folge hat, als bei Mäusen mit normalem kardialen Troponin (483). Schlussfolgert man hieraus eine geringere Hemmbarkeit der aktiven Muskelkraft durch eine Aktivierung der PKC α auch im Skelettmuskel, lässt dies eine Reduktion der PKC α -Aktivität als Ursache für die Kraftsteigerung in dB+ und dBdB nach *IR* im Skelettmuskel in Frage stellen.

Auch eine Bedeutung der AMPK in diesem Zusammenhang ist denkbar. Als Energiesensor der Zelle und entscheidendem Regulator der Muskelatrophie (287–291), könnte ihre Aktivität hier einen direkten Einfluss auf die aktive Kraft nehmen. Allerdings sind die Befunde bezüglich der Bedeutung dieses Signalwegs schwer einzuordnen. Die Aktivierung der AMPK scheint weder durch *IR* noch durch einen diabetischen Genotyp wesentlich beeinträchtigt zu sein. Da die Aktivierung sich im physiologischen Rahmen bewegt, kann die AMPK also vermeintlich weiterhin als Energiesensor fungieren, nur könnte deren Empfindlichkeit über die veränderte Expression reguliert sein.

Insbesondere im *M. psoas* kommt es nach *IR* und bei dBdB zu einer verstärkten Expression der AMPK, die sich jedoch nur in den dBdB-Gruppen signifikant zeigte und dort auch signifikant stärker ausfiel als bei dB+. Eine derartige Steigerung wäre ihrerseits tendenziell atrophiefördernd. Dennoch verhält sich die aktive Kraft hier fast spiegelbildlich: Trotz vermehrter Aktivierung der AMPK ist die Kraft nach *IR* im *M. psoas* gesteigert. Womöglich handelt es sich bei der Hochregulation also um einen Kompensationsmechanismus einer pathologischen Veränderung des Muskelstoffwechsels, die zu vermehrtem Energieverbrauch führt.

Die zusätzlich erhöhte Expression der AMPK bei dBdB verglichen mit dB+ könnte dann erklären, warum die Kraftsteigerung nach *IR* dort deutlich geringer ausfällt. Im *M. tibialis ant.* ergibt sich jedoch in der biomechanischen Messung das gleiche Bild wie im *M. psoas*, ohne dass eine signifikante Steigerung der AMPK-Expression beobachtet werden konnte. Ob also dieser Effekt nur in einzelnen Muskeln eine Rolle spielt, oder aber die *n*-Zahl unserer Untersuchung zu gering war, um auch im *M. tibialis ant.* den Effekt belegen zu können, bleibt unklar.

Vor den in dieser Arbeit erhobenen Befunden erscheint eine einleuchtende Erklärung für die gesteigerte aktive Kraft in einer Analogie zum Frank-Starling-Mechanismus zu liegen. Wie in der Einleitung erläutert, kommt es dabei zu einer dehnungsabhängigen Steigerung der aktiven Kraft im Muskel, wobei Titin bei der Vermittlung dessen eine entscheidende Rolle spielt (18–20, 351). Dabei bringt Titin bei Dehnung über seine quere Verspannung zwischen den Sarkomerfilamenten diese näher zueinander, sodass sich deren Interaktionsfähigkeit und damit auch die aktive Kraft erhöht (18–20, 351). Aufgrund dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass ein versteiftes Titinprotein bei gleicher Dehnung einen stärkeren Zug auf die Filamente auswirkt, und somit eine Versteifung von Titin auf die Muskelmechanik einen ähnlichen Effekt hat wie eine Sarkomerdehnung. Eine Verstärkung des Mechanismus durch steifere Titinisoformen ist bereits nachgewiesen worden (20, 21).

Dieser Effekt erklärt die gleichartigen Befunde in der passiven und aktiven Muskelmechanik. Zudem erhöht sich die maximale aktive Kraft unter Vordehnung völlig parallel zum Effekt bei unterschiedlich starker Aktivierung. Auch dies deutet also an, dass der Mechanismus, der die Differenz zwischen den Gruppen in beiden Experimenten vermittelt derselbe ist. Dazu passt auch der Befund der nach *IR* gesteigerten Calciumsensitivität, da im Rahmen der Rekrutierung des Frank-Starling-Mechanismus eine Steigerung der Calciumsensitivität vorbeschrieben ist (18–20, 351). Auch wenn die dehnungsabhängige Calciumsensitivität im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, ließe sich durch die beobachtete Versteifung von Titin und damit vermeintliche Rekrutierung des Frank-Starling-Mechanismus bereits bei einer Ruhedehnung des Muskels die Steigerung der Calciumsensitivität auch hier erklären.

Zudem zeigt sich im Kurvenverlauf der aktiven Muskelkraft bei unterschiedlicher Vordehnung eine überproportionale Zunahme in dB+ und dBdB nach *IR*. Auch diese Beobachtung lässt sich durch eine

vermehrte Rekrutierung und daraus resultierender verstärkter Längensensibilität des Frank-Starling-Mechanismus bei versteiftem Titinprotein erklären.

Die Unterschiede in der biomechanischen Kraftmessung zwischen dBdB und dB+ ließe sich auch durch die Wirkung des Frank-Starling-Mechanismus erklären. Die reduzierte Steigerbarkeit der aktiven Kraft nach *IR* bei dBdB verhält sich ebenfalls völlig analog zu den Befunden aus der passiven Muskelmechanik. Die höhere passive und aktive Kraft bei dBdB *sham* im *M. psoas* deuten an, dass dort bereits eine vermehrte Titinversteifung vorliegt. Da aber das Ausmaß einer aktiven Kraftsteigerung durch die vermehrte Versteifung von Titin und der damit verbundenen Annäherung der kontraktilelemente des Sarkomers begrenzt ist, erklärt dies plausibel die verminderte Steigerbarkeit der aktiven und passiven Muskelkraft bei dBdB-Tieren bei einer *IR*-Behandlung.

Im *M. tibialis ant.* hingegen ist die Steigerbarkeit der aktiven und passiven Kraft bei dBdB-Tieren nach *IR* zwar auch eingeschränkt, jedoch ohne, dass eine erhöhte Ausgangskraft bzw. Steifigkeit vorlag. In diesem Muskel zeigte sich zudem eine signifikante Reduktion der Titinmenge bei dBdB *sham* verglichen mit dB+ *sham*. Da also die Titinmenge bei dBdB bereits deutlich reduziert war und trotzdem eine vergleichbare passive Kraft in der Biomechanik erreicht wurde, ist anzunehmen, dass im *M. tibialis ant.* die Titinproteine bereits vermehrt versteift vorlagen. Dies verhält sich analog zu früheren Befunden, dass bei Diabetes Titin am Herzen versteift ist (424). Bei einem Diabetes mellitus scheint also der Frank-Starling-Mechanismus als Kompensationsmechanismus zu fungieren und so die konstante passive Kraft im *M. tibialis ant.* bei dBdB-Tieren trotz einer reduzierten Titinexpression erklären.

Die vermehrte basale Aktivität des Frank-Starling-Mechanismus bei dBdB würde zudem gut eine verglichen mit dB+ reduzierte dehnungsabhängige Steigerbarkeit der aktiven Kraft erklären. Da eine Gewebeversteifung und so erreichte Calciumsensitivierung für das Aufrechterhalten einer normalen Calciumsensitivität nötig ist, ist bei weiterer Annäherung der kontraktile Filamente diese vermeintlich nur noch weniger steigerbar als im Gesunden.

Zusammenfassend korreliert die Titin-basierte passive Steifigkeit der Muskelfasern mit einer gesteigerten aktiven Kraft, wobei die Wirkung des Frank-Starling-Mechanismus eine entscheidende Rolle spielen könnte.

4.2.3 PKC α

Im folgenden Abschnitt sollen kurz die biochemischen Befunde zur PKC α diskutiert und vor der Literatur eingeordnet werden. Deren eventueller Einfluss auf die Biomechanik ist bereits oben diskutiert worden. Eine Gegenüberstellung im Bezug auf das Diabetes-Modell folgt im entsprechenden Kapitel.

Im intermuskulären Vergleich verhält sich die aktivierende Phosphorylierung sich in allen Muskeln nach *IR* ähnlich. Eine Tendenz hin zur Reduktion nach *IR* findet sich in allen Muskeln, ist aber nicht in allen statistisch signifikant. Grund dafür könnte eine unterschiedlich intensive Ausprägung des Effektes oder aber eine zu geringe n-Zahl für den signifikanten Nachweis in unserer Untersuchung sein. Am geringsten ausgeprägt ist der Effekt im *M. soleus*. Hier ist die relative Phosphorylierung in der *sham* und *IR* Gruppe nahezu gleich. Da der *M. soleus* der einzige hier betrachtete vornehmlich langsame, oxidative Muskel ist (7), könnte dies den Unterschied erklären. Eine muskelfaserspezifische PKC α -Aktivierung bzw. Hemmung ist aber bisher noch nicht beschrieben worden. Daher wären weitere Experimente notwendig, um diesen Zusammenhang belegen zu können.

Unabhängig von der Variation im Rahmen der experimentellen Variablen zeigt die aktivierende PKC α -Phosphorylierung ein muskelspezifisches Muster. Dieses bestand in allen Gruppen gleichermaßen und zeigt daher auf, dass der Anteil der phosphorylierten und damit aktivierten PKC α in den unterschiedlichen Skelettmuskeln unterschiedlich groß ist. Dies könnte einen Einfluss auf eventuelle zelluläre Veränderungen im Rahmen einer *IR*-Behandlung nehmen und müsste diesbezüglich gezielt untersucht werden.

Bemerkenswert wirkt dieser Befund der scheinbar verminderten PKC α -Aktivität vor dem Hintergrund, dass bei Herzinsuffizienz sowohl erhöhte Adrenalinpiegel, als auch eine gesteigerte Aktivität der Angiotensin-Aldosteron-Achse bekannt sind (104, 105, 119, 122, 173, 278). Da sowohl eine α 1-adrenerge Stimulation, als auch eine Aktivierung des AT1-Rezeptors, die PKC α Aktivität steigern (278, 279), wäre anzunehmen gewesen, dass diese auch im Skelettmuskel bei Herzinsuffizienz erhöht ist.

Es handelt sich hier jedoch um ein sehr frühes Beobachtungszeitfenster, in dem vermeintlich eine funktionale Herzinsuffizienz noch nicht vollständig ausgebildet ist, und es ist außerdem bekannt, dass eine vermehrte Wirkung von Myostatin am Skelettmuskel nach *IR* schnell und wirkungsvoll einsetzt (84). Für Myostatin ist wiederum bekannt, dass es über den *Regulator of G-Protein-Signaling* die PKC α -Aktivität hemmt (153, 154). Ein derartiger hemmender Effekt scheint hier also zu überwiegen (siehe Abb. 4.2.3). Denkbar ist auch, dass über die PKC α -stimulierenden Achsen eine vermehrte Expression angeregt wird, die jedoch im frühen Betrachtungszeitraum dieser Arbeit noch nicht voll ausgeprägt sind, während die aktivierende Phosphorylierung über eine vermehrte Myostatinwirkung gehemmt wird. Wenn dann im späteren Verlauf die gesteigerte Expression zu einer insgesamt erhöhten PKC α -Aktivität führen würde, könnte dies eine Muskelschwäche weiter eskalieren.

Interessant ist zudem, dass die PKC α im Skelettmuskel eine Rolle in der Apelin-Bildungsregulation einnimmt (115). Eine Reduktion der PKC α -Aktivität würde also erwartungsgemäß eine Reduktion des Apelinspiegels nach sich ziehen, was in der Tat bei Herzinsuffizienz, also einer häufigen direkten Folgeerkrankung der Myokardischämie, beobachtet wird (106). Da Apelin seinerseits wesentlich an der Skelettmuskelregeneration und dessen Erhalt beteiligt ist (107, 111, 112), könnte ein auf diesem Wege reduzierter Apelinspiegel die Muskelfunktion weiter verschlechtern. Gegen diese These spricht jedoch die Beobachtung, dass die AMPK-Phosphorylierung nicht wesentlich verändert ist, weil beobachtet wurde, dass Apelin die AMPK-Phosphorylierung erhöht (107, 113). Entweder ist der Spiegel also nicht wirksam reduziert, oder die Wirkung auf die AMPK wird von einem die Phosphorylierung steigerndem Einfluss überdeckt. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf wäre auch

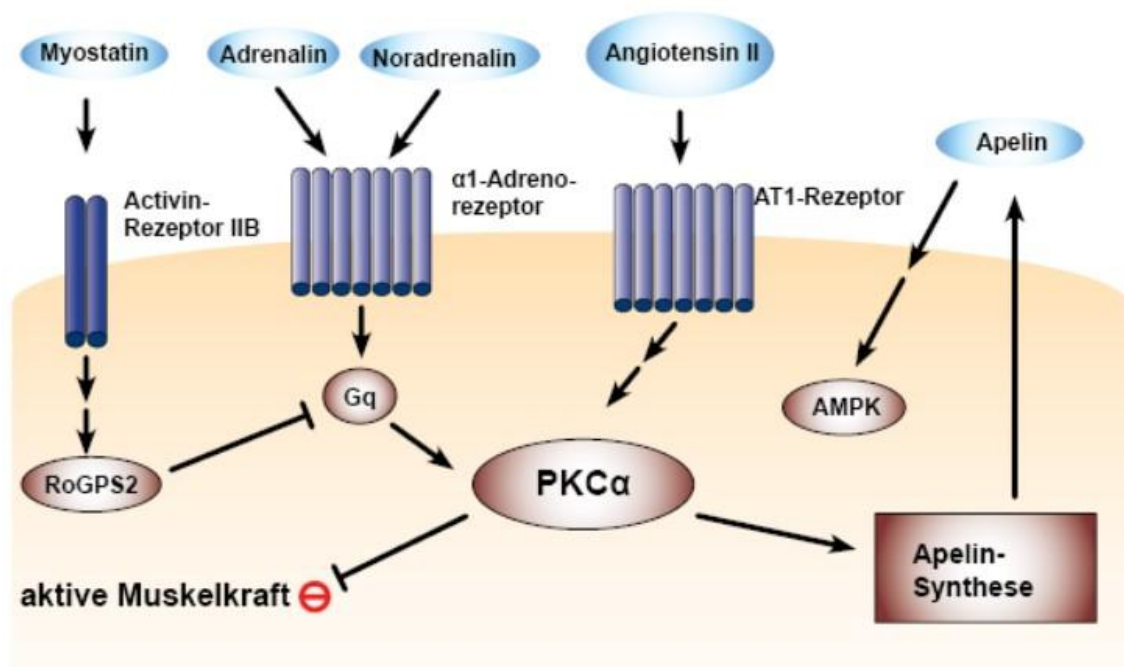


Abb. 4.2.3 Mögliche Regulationswege der Proteinkinase Ca (PKC α) am Skelettmuskel nach myokardialer Ischämie. Adrenalin- und noradrenalinabhängig kommt es über den α -Adrenorezeptor, zu einer Aktivierung des kleinen Gq-Proteins, das die Aktivität der PKC α steigert. Gleichzeitig aktiviert auch Angiotensin II über Angiotensin-Rezeptor 1 (AT1-Rezeptor) indirekt die PKC α . Die Aktivierung wird über Myostatin, das an den Activin-Rezeptor IIB bindet und indirekt den Regulator of G-protein Signalling 2 (RoGPS2) aktiviert, welcher das aktivierende Gq-Protein hemmt, gehemmt. Die PKC α reduziert die aktive Muskelkraft und regt die Apelinsynthese an. Apelin steigert seinerseits die Aktivität der Adenosin-Monophosphat-abhängigen Kinase (AMPK).

denkbar, dass die Signalkaskade von Myostatin über die PKC α und den Apelin Spiegel auf die AMPK-Phosphorylierung in dem frühen Betrachtungsfenster dieser Arbeit noch nicht ihre volle Ausprägung erreicht hat.

4.2.4 AMPK

Im folgenden Abschnitt sollen nun auch die biochemischen Befunde zur AMPK diskutiert und vor der Literatur eingeordnet werden. Deren eventueller Einfluss auf die Biomechanik ist bereits oben diskutiert worden. Eine Gegenüberstellung im Bezug auf das Diabetes-Modell folgt im entsprechenden Kapitel.

Tendenziell fand sich in einzelnen Muskeln eine Erhöhung der Expression nach *IR*, die jedoch lediglich im M. psoas für den dBdB-Genotyp signifikant war. Gleichzeitig fand sich die Tendenz, dass die Expression in dBdB gegenüber dB+ ebenfalls erhöht war. Im M. EDL wiederum fand sich in der dBdB-Gruppe eine fast signifikante Reduktion der Expression nach *IR*, die ihrerseits verglichen mit der dB+ *IR*-Gruppe signifikant verringert war.

Die Aktivierung der AMPK durch aktivierende Phosphorylierung an Threonin 172 zeigte sich in keiner Gruppe unter keinen experimentellen Bedingungen verändert. Es zeigte sich hingegen ein muskelspezifisches Aktivierungsmuster, das von der experimentellen Variation unbeeinträchtigt Bestand hatte. Da die AMPK im Energiestoffwechsel der Muskelzellen eine wesentliche Rolle spielt und dort als Energiesensor agiert (287–291), ist bei experimentell unbeeinträchtigter Aktivierung anzunehmen, dass sie diese Funktion weiter erfüllen kann. Die Sensitivität und Effektivität dieser Sensorfunktion könnte aber durch die veränderte Expression beeinträchtigt sein.

In Anbetracht der gesteigerten Expression der AMPK nach *IR* ist von einer atrophiefördernden Wirkung auszugehen. Denn in Antwort auf ein reduziertes Energielevel in der Zelle, regt die AMPK die Proteindegradation und Autophagie an (113, 137, 292–299, 301–303). Gleichzeitig erhöht sie die muskelluläre Glucoseaufnahme und Fettsäureoxidation (113, 137, 292–299, 301–303). Die reduzierte Titin-Expression nach *IR* bei dBdB-Tieren könnte also mit der erhöhten AMPK-Expression zusammenhängen. Eine statistische Signifikanz dafür, dass sowohl eine reduzierte Titinexpression als auch eine vermehrte AMPK-Expression innerhalb des selben betrachteten Muskels auftraten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden.

Es kann durch die Wechselwirkung der AMPK-Kaskade mit der CamK-Kaskade nach *IR* auch eine Steigerung der Aktivität dieser Kaskade vermutet werden. Es ist bekannt, dass es zwischen beiden Kaskaden zu Kreuzaktivierung kommt (202, 203). Wenn also durch eine erhöhte Expression die Aktivität der AMPK insgesamt erhöht wird, könnte dies auch die Aktivität der CamKII nach *IR* steigern. Dies könnte zudem die beobachtete nicht wesentliche Veränderung der Phosphorylierung von Titin an Serin 12022 erklären. Hier wäre durch die vermeintlich reduzierte Aktivität der PKC α eine ebenfalls reduzierte Phosphorylierung anzunehmen gewesen. Wenn aber gleichzeitig die CamKII vermehrt aktiv ist, könnte diese, da sie auch Serin12022 spezifisch phosphorylieren kann, die defizitäre Phosphorylierung durch die PKC α ausgleichen und so den Befund erklären. Auch mit den Befunden bei der aktiven Kraft würde eine Aktivierung der CamK-Kaskade aufgrund ihrer prohypertrophen Wirkung gut korrespondieren. Direkt hypertrophe Einflüsse sind jedoch vor dem Hintergrund der beobachteten Reduktion der Titinmenge scheinbar von untergeordneter Bedeutung, wie oben ausführlicher erläutert wird. Dennoch erscheint in diesem Zusammenhang die Untersuchung des Verhaltens der CamK nach *IR* im Skelettmuskel vielversprechend.

Bei einem gesteigerten Apelin Spiegel wäre eine vermehrte AMPK-Phosphorylierung zu erwarten. Denn Apelin aktiviert AMPK durch Phosphorylierung (107, 113, 303). Allerdings konnte hier eine solche vermehrte Phosphorylierung nach *IR* nicht beobachtet werden. Grund dafür könnte wie oben beschrieben sein, dass der Steigerung des Apelin Spiegels ein längerer Signalweg vorausgeht, sodass sie eventuell im Betrachtungszeitraum noch nicht eingetreten ist bzw. noch nicht ihre volle Wirksamkeit erreicht hat.

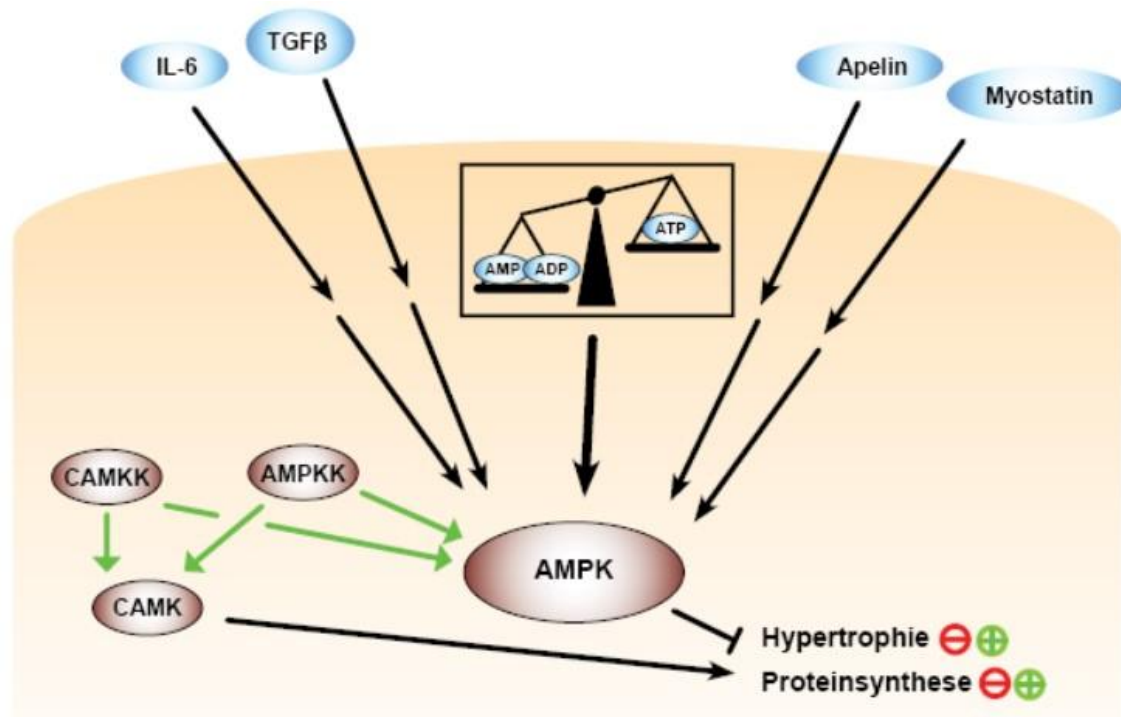


Abb. 4.2.4 Regulation der Adenosin-monophosphat-abhängigen Kinase (AMPK) im Skelettmuskel bei myokardialer Ischämie. Die AMPK wird durch die proinflammatorischen Signalstoffe Interleukin 6 (IL-6) und *Tumor Growth Factor β* (TGFβ) indirekt in ihrer Aktivität gesteigert. Zudem steigern auch Apelin und Myostatin indirekt ihre Aktivität. Endogen wird sie durch eine Verschiebung des Adenosin-monophosphat (AMP) und Adenosin-diphosphat (ADP) Verhältnisses zu Adenosin-triphosphat (ATP) zugunsten erster aktiviert. Sie hemmt die Muskelhypertrophie sowie die Proteinsynthese. Gleichzeitig kommt es über die AMPK-Kinase (AMPKK) zu einer wechselseitigen Aktivierung mit der Calmodulin-abhängige Kinase (CAMK)-Kaskade, bei der die AMPKK auch die CAMK aktiviert und die CAMK-Kinase (CAMKK) neben der CAMK auch die AMPK aktiviert. Die CAMK jedoch steigert die Muskelhypertrophie und Proteinsynthese.

Die gesteigerte Expression der AMPK bei Tieren mit *IR* könnte ein indirektes Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion sein. Denn diese ist im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz bekannt (120–122), für die Frühphase nach einer Myokardischämie liegen diesbezüglich noch keine Untersuchungen vor. Sollte es bereits früh zu einer systemischen Entzündungsreaktion kommen, könnte dies eine mögliche Ursache für eine gesteigerte AMPK-Aktivität sein, da sowohl IL-6 als auch TGFβ die AMPK-Aktivität erhöhen (137, 153).

Der Effekt von Myostatin auf die AMPK im Rahmen der Herzerkrankung ist unklar. Nimmt man unter pathologischen Bedingungen eine Analogie zu der physiologischen Steigerung der AMPK-Expression durch Myostatin am Skelettmuskel an (312), könnte auch dies durch seine frühe Steigerung (84) die hiesigen Beobachtungen schlüssig erklären (siehe Abb. 4.2.4).

4.3 Gegenüberstellung im Bezug auf Diabetes mellitus

Wie bereits in der bisherigen Diskussion teilweise herausgearbeitet wurde, finden sich im Rahmen der Untersuchungen in dieser Arbeit signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen dB+ und dBdB. Es ist anzunehmen, dass diese Unterschiede vermeintlich auf dem menschlichen Diabetes mellitus übertragbar sind. Die gravierenden Unterschiede in der Muskelmechanik wurden bereits oben diskutiert. Zudem fanden sich Unterschiede in der Titindegradation und Titinexpression sowie Beeinträchtigungen der PKCα-Aktivierung und der AMPK-Expression.

Die Aktivierung der PKCα ist bei dBdB teilweise geringer als bei dB+. Dies zeigt sich darin, dass bei vergleichbarer Expression nur eine geringere Phosphorylierung im M. gastrocnemius und M. EDL vorliegt. Unterschiede finden sich jedoch ausschließlich in den *sham* Gruppen und gehen nach *IR* verloren. Da eine geringere PKCα-Phosphorylierung die aktive Muskelkraft tendenziell steigert,

könnte es sich hierbei um einen Kompensationsmechanismus einer durch die diabetische Stoffwechsellage gestörten Muskelmechanik handeln. Die Beobachtung, dass der Unterschied zwischen dB+ und dBdB nach *IR* verloren geht, lässt vermuten, dass die regulativen Mechanismen, die nach *IR* die PKC α -Phosphorylierung steuern, gegenüber denen, die mit dem diabetischen Genotyp einhergehen überwiegen, und deren Einfluss somit nicht mehr signifikant nachweisbar ist. Widersprüchlich wirken die Befunde vor dem Hintergrund des bei Diabetes mellitus bekanntermaßen reduzierten Myostatinpiegeln, da Myostatin die PKC α -Aktivität hemmt (153, 154, 419) und somit eine gesteigerte Aktivität zu erwarten gewesen wäre. Auch dieser Mechanismus scheint also durch die diabetische Stoffwechsellage beeinträchtigt zu sein.

Dennoch ist eine Reduktion der PKC α -Aktivität überraschend. Bei dBdB-Tieren wurde am Herzen eine gesteigerte PKC α -Aktivität beschrieben (424). Da die Tiere hyperinsulinäm sind und zudem bekannt ist, dass Insulin die PKC α -Aktivität stimuliert, wäre eigentlich eine Steigerung zu erwarten gewesen. Womöglich überwiegt also funktional die Insulinresistenz gegenüber diesem Einfluss.

Auffällig ist außerdem, dass die Expression der PKC α bei dBdB nicht beeinträchtigt zu sein scheint, sondern lediglich die aktivierende Phosphorylierung. Es ist eine Beeinträchtigung des Calciumhaushaltes in Skelettmuskeln bei Diabetes mellitus bekannt (413–415). Da Calcium als Coaktivator der PKC α agiert (266–272), könnten diese Beeinträchtigungen eine veränderte Aktivierung erklären.

Zudem könnten die Konsequenzen einer Reduktion der PKC α -Aktivität nach *IR* bei dBdB milder ausfallen als bei dB+. Grund dafür ist wie oben erläutert, dass bei Hyperinsulinämie ein erhöhter Apelinpiegel vorliegt (115, 448–451). Der erhöhte Ausgangspiegel könnte also die Konsequenzen einer Reduktion des Hormonspiegels im Rahmen des Infarktes begrenzen und einen schützenden Effekt auf die Intaktheit der Skelettmuskeln haben. Da für den erhöhten Apelinpiegel die Hyperinsulinämie das entscheidende Kriterium zu sein scheint, ist eine Übertragbarkeit auf den menschlichen Diabetes mellitus Typ II mit Hyperinsulinämie anzunehmen. Dies korrespondiert gut mit einer Gruppe von Befunden, die als Obesity-Paradox bekannt sind, bei denen ein prämorbidetes Übergewicht einen protektiven Effekt auf den Muskelabbau bei kritischer Krankheit ausübt (87). Dieser Effekt wird in der Einleitung ausführlicher erläutert.

Die AMPK-Expression nach *IR* ist ebenfalls bei dBdB beeinträchtigt. Interessant ist, dass diese Unterschiede erst nach *IR* nachweisbar sind. Dies könnte entweder daran liegen, dass eine spezifisch andere Expression erst nach *IR* erfolgt oder aber, dass eine Beeinträchtigung in den *sham* Gruppen so gering ausfällt, dass hier in Anbetracht der geringeren n-Zahl keine signifikanten Veränderung gefunden werden konnte. Da die AMPK wie oben diskutiert funktional einer Insulinresistenz entgegenwirkt, ist eine vermehrte Aktivierung im Sinne eines Kompensationsmechanismus für den pathologischen Energiestoffwechsel bei dBdB denkbar. Dieser Mechanismus könnte dann auch bei der diabetischen Muskelschwäche eine Rolle spielen, denn es konnte gezeigt werden, dass diese ihren Ursprung innerhalb der Muskeln hat (407).

Dass die Kraftsteigerung in der dBdB Gruppe im M. psoas geringer ausfällt, ließe sich dann durch die hier noch stärker gesteigerte AMPK-Expression begründen. Allerdings findet sich in den mechanischen Messungen des M. tibialis ant. das gleiche Muster, ohne, dass die Veränderungen der AMPK-Expression hier signifikant waren. Ob also hier dieser *Pathway* eine untergeordnete Rolle spielt, oder die Signifikanz nur aufgrund der geringen n-Zahl in dieser Untersuchung nicht belegt werden konnte, bleibt unklar.

Scheinbar sorgt ein Diabetes-typischer Einfluss auf die AMPK-Regulation für eine muskelspezifisch differenziert ausgeprägte Regulation. Wie jedoch die verschiedene Wirkung in unterschiedlichen Skelettmuskeln zu erklären ist, bleibt unklar. Auch wenn es sich beim M. psoas um einen gemischten Muskel handelt und im M. EDL ausschließlich schnelle, glykolytische Fasern exprimiert werden (7, 237, 484, 485), wäre, wenn die Fasertypen entscheidend sind, auch ein veränderter Einfluss auf den fast ausschließlich langsam, oxidativen M. soleus zu erwarten gewesen (7). Wie genau und nach welchen Kriterien also die differenzierte *Pathway*-Regulation in unterschiedlichen Skelettmuskeln abläuft, lässt sich aufgrund dieser Daten nicht ableiten, jedoch die Erkenntnis, dass diese Regulation

so gravierend eingreift, dass die Richtung in die ein anderer Einfluss führt, sogar signifikant umgekehrt werden kann.

4.4 Titin als Integrator und Stellschraube der mechanosensitiven Muskeltrophieregulation

Es ist schon seit längerem bekannt, dass das Titinprotein mehr als ein rein strukturelles Sarkomerprotein ist. Neben seiner komplex-regulierten und bedeutenden mechanischen Funktion scheint es auch in der Regulation der Muskeltrophieregulation eine entscheidende Rolle zu spielen. In diesem Kapitel soll ein bisher nicht bewiesener, aber aufgrund bisheriger Befunde vorhersagbarer Mechanismus vorgestellt werden, in dem Titin im Muskel- und Herzmuskelzellstoffwechsel eine zentrale Rolle einnimmt und eine interessante neue Zielstruktur für pharmakologische Interaktionen bieten könnte.

Wie in der Einleitung erläutert interagiert Titin mit einer Reihe von Proteinen wie den MARP oder LIM-Proteinen, die an der Regulation der Muskeltrophieregulation beteiligt sind (29–31, 367–369). Deren Regulation wie auch die der Titinkinase sind mechanosensibel und von der Muskeldehnung abhängig (29–31, 367–369, 392, 394). Auch wenn der Ursprung dieser Mechanosensibilität noch nicht experimentell eingegrenzt werden konnte, ist aufgrund der Interaktion dieser Proteine mit Titin, dieses vermeintlich entscheidend. Denn durch seine Lage im Sarkomer ergeben sich kontraktionsabhängige Dehnungs- und Stauchungseinflüsse auf das Titinprotein, und es ist naheliegend, dass diese mechanischen Impulse die Interaktion mit den mechanosensiblen Signalproteinen beeinflussen und so vermutlich deren Mechanosensibilität im Bezug auf die Muskelaktion begründen.

Dabei ist die Konformation der signalproteininteragierenden Domänen entscheidend. So könnte die Bindungsaffinität von der Titinkonformation in einer bestimmten Domäne abhängig sein und so direkt die Wirkung auf das Signalprotein vermitteln. Dieser Mechanismus erscheint als einleuchtendes Werkzeug um eine der Belastung eines Muskels angemessene Muskeltrophieregulation zu gewährleisten. Dies könnte also sowohl die hypertrophe Wirkung eines muskulären Trainings auf den Muskel als auch die Muskelatrophieregulation bei Inaktivität begründen.

Gleichzeitig ist Titin jedoch auch ein funktionales Sarkomerprotein mit einer vielseitig regulierten Biomechanik. Unterschiedliche bekannte und vermeintlich auch unbekannt Signalwege nehmen darauf Einfluss und erhöhen wie hier in dieser Arbeit gezeigt wurde die passive Steifigkeit von Titin nach *IR*.

Vor diesem Hintergrund ergibt sich die Frage, ob sich auch durch Modifikationen von Titin in anderen Domänen die Dehnung bzw. Stauchung in seinen Interaktionsdomänen verändert. Durch seine feste Anbindung im Sarkomer ist anzunehmen, dass bei gleichbleibender Sarkomerdehnung beispielsweise durch einen versteifenden Einfluss auf das Titinprotein durch eine Modifikation der PEVK-Region, die Spannung über das Protein und damit die Dehnung anderer Domänen erhöht würden.

Dieser Spannungseffekt wäre aber vermeintlich nicht über das gesamte Protein gleich. Es ist davon auszugehen, dass Interaktionen mit anderen, nicht modifizierten Proteinen, die bindenden Titinregionen stabilisieren. Dies gilt insbesondere für die Domänen, die an Aktin oder Myosin gebunden vorliegen. Es ist also ferner anzunehmen, dass je nach Position der Versteifung diese in ihrem direkten Umfeld stärker wirkt, als weiter in der Aminosäurefolge entfernt. Eingerahmt werden könnte dieses Umfeld über Fixationspunkte wie eine Bindung an ein anderes Protein oder aber eine titininterne Interaktion.

Dies würde bedeuten, dass über eine Regulation der Titinmechanik die Mechanosensibilität der Muskeltrophieregulation spezifisch reguliert wird, wobei unterschiedliche Modifikationsstellungen eventuell auf unterschiedliche Signalwege differenziert wirken. Während die Aktin oder Myosin bindenden Domänen vermeintlich weniger stark in ihrer Mechanik eingeschränkt sind, rückt die Interaktionsstelle mit MARP in den Vordergrund, da diese zwischen den Sarkomerproteinen besonders exponiert ist (367–369).

Es ist bekannt, dass es durch Dehnung zu einer vermehrten Expression von MARP und einer Translokation in den Kern kommt (25). Am Herzen ist bei der dilatativen Kardiomyopathie die

Expression von CARP, DARP und ankrd2 erhöht (372). Außerdem konnte gezeigt werden, dass DARP im Herzen bei Diabetes sowie vermehrte Glucosezufuhr hochreguliert und bei Nahrungsmangel herunterreguliert ist (373). Erneut erwähnt sei die Beobachtung, dass dieser Signalweg im Skelettmuskel bei Herzerkrankung eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (78, 94, 119, 171, 213, 216, 217).

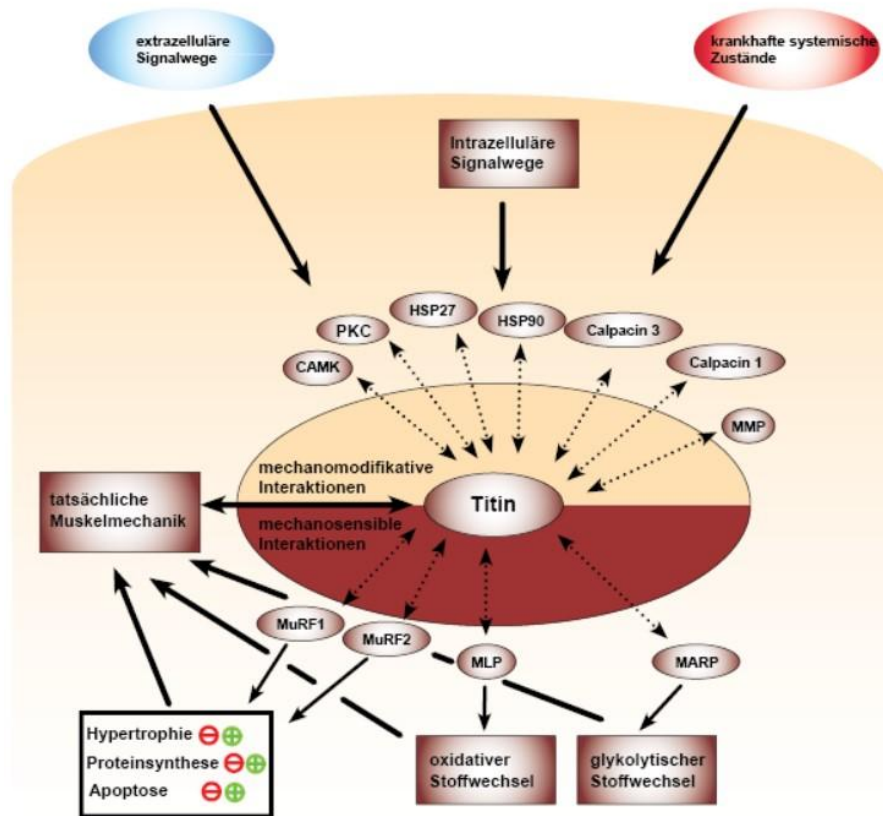


Abb. 4.4.1 Titin als zentrale Stellschraube des skelettmuskulären Stoffwechsels. Titin vermittelt durch vielfältige Interaktionen zwischen mechanomodifikativen Interaktionspartnern und mechanosensiblen Interaktionspartnern. Die Summe dessen nimmt direkten Einfluss auf die tatsächliche Muskelmechanik. Sowohl extrazelluläre, als auch intrazelluläre Signalwege und systemische krankhafte Zustände nehmen Einfluss auf die Interaktionspartner von Titin. Hier dargestellt sind die Calmodulinabhängige Kinase (CAMK), die Proteinkinase Ca, das *Heat shock protein* 27 und 90 (HSP27, HSP 90), Calpacin 3 und 1 und Matrix-Metallo-Proteinase (MMP). Seinerseits hat Titin einen Einfluss auf die *Muscle RING-finger proteins* 1 und 2 (MuRF1, MuRF2), die ihrerseits einen Einfluss auf die Muskelhypertrophie (Hypertrophie), Proteinsynthese und Apoptose nehmen, die wiederum die Muskelmechanik beeinflussen. Titin interagiert zudem mit den *Muscle Lin-11, Islet-1, and Mec-3-Proteinen* (MLP), die Einfluss auf einen oxidativen Stoffwechsel haben sowie mit *Muscle Ankyrin Repeat Proteine* (MARP), die einen Einfluss auf den glykolytischen Stoffwechsel haben, wobei beide die tatsächliche Muskelmechanik beeinflussen können.

Einflussfaktoren zu integrieren. Alle auf die Titinmechanik projizierenden Signalwege mit mechanischen Konsequenzen können je nach Lage und Bezug der Modifikationsstelle zu Signalprotein-interagierenden Domänen, differenziert Einfluss auf die Muskelhypertrophie nehmen. Gleichzeitig wären all diese Effekte aber auch noch von dem tatsächlichen mechanischen Input der Muskelzelle abhängig. So wäre Titin eine modulierbare mechanosensitive Stellschraube (siehe Abb. 4.4.1).

Diese Befunde ließen sich womöglich durch eine beeinträchtigte Titinmechanik, die eine Dehnung der MARP-Interagierenden Domänen verursacht erklären, ein mechanistischer Nachweis steht jedoch noch aus. Zudem kann es bei der dilatativen Kardiomyopathie gleichzeitig auch noch tatsächlich zu einer vermehrten Dehnung der Kardiomyozyten kommen. Wenn dies der Fall ist, könnte sich die Wirkungen einer gesteigerten Dehnungsbelastung bei gleichzeitig versteiftem (14) und damit vermeintlich

sensitiviertem Titin potenzieren. Dies könnte das gravierende Ausmaß der herzmuskulären Veränderungen bei der dilatativen Kardiomyopathie erklären.

Ein derartiger neuartiger Mechanismus, wie er hier postuliert wird, würde die Möglichkeit bieten, eine enorme Vielfalt an

Die Sensitivität und Mechanik dieser Stellschraube könnte dann gewebespezifisch und abhängig vom aktuellen systemischen Zustand wie Krankheit, Hunger oder vermehrte körperliche Belastung modifiziert werden. In der Konsequenz würde die Reaktion der Muskelatrophie auf die tatsächliche mechanische Beanspruchung spezifisch reguliert. Gleichzeitig könnte aber eine Verstellung dieser Stellschraube hin zu einer atrophieförderlichen Wirkung wie ich sie hier für die Herzinsuffizienz und den Diabetes mellitus postulieren will, weitreichende Folgen haben.

Wenn sich ein solcher Mechanismus experimentell belegen ließe, würde dieser gleichzeitig ein großes Feld für die pharmazeutische Forschung bieten. Denn dann wären sowohl Substanzen, die die Titinmechanik modifizieren, als auch Substanzen, die die Interaktion mit anderen Titinmechanik-modifizierenden Proteinen, titinabhängigen Signalproteinen oder aber die Aktivität der Titinkinase selbst beeinflussen, von großem therapeutischem Interesse. Sie könnten dazu dienen, pathologische Veränderungen in dieser Stellschraube der Muskelatrophie zu korrigieren.

Gleichzeitig könnte eine Modifikation der Titinregulation auch funktional andere Formen der Muskelatrophie oder aber auch Muskelhypertrophie antagonisieren. Selbst wenn die mechanische Sensitivität nicht beeinträchtigt ist, könnte ein muskeltrophie-förderlicher Einfluss durch eine therapeutische Manipulation auch erwartet werden, wenn eine Muskelatrophie oder eine Muskelhypertrophie auf anderen Wegen zustande kommt.

Ein zu erwartendes Hindernis eines pharmakologischen Eingriffs ist die Titinexpression in anderen Geweben, insbesondere die im Herzmuskel. Die im Herzen exprimierten Titinformen sind den Skelettmuskulären strukturell ähnlich, weisen aber teilweise abweichende Sequenzen und andere Interaktionsproteine auf. Soll eine gewebespezifische Wirkung gewährleistet werden, muss also ein spezifischer Eingriff an einer gewebespezifischen Sequenz oder Interaktion adressiert werden.

Zudem kommt es auch in glatter Muskulatur und nicht-muskulären Zellen zu einer Titinexpression (486–488). Dieses unterscheidet sich jedoch in seiner Struktur und Interaktion maßgeblich vom Skelett- und Herzmuskulären (488), sodass auch hier theoretisch Wechselwirkungen durch das Substanzdesign vermieden werden könnten. Da zudem im Skelett- und Herzmuskel die Titinkonzentration durch den Sarkomergehalt verglichen mit anderen Geweben um ein vielfaches höher ist, ist schon aus diesem Grund eine Wirkungspräferenz für muskuläres Gewebe anzunehmen.

Im typisch westlichen Krankheitsspektrum wäre natürlich ein pharmakologischer Eingriff am Herzen besonders interessant. Die hier beschriebenen Vermutungen über eine Titin-Muskelzellatrophie-Stellschraube, könnten sich mechanistisch auf das Herz übertragen lassen. So könnte versucht werden lebenslimitierende Herzerkrankungen, die mit einer Herzmuskelzellatrophie oder -hypertrophie einhergehen, zu adressieren.

Zusammenfassend ergeben sich also einige Hinweise auf einen relevanten Titinmechanik-abhängigen Einfluss auf die Muskelatrophie. Wenn sich dieser Einfluss beweisen lässt, würde dies ein neues und vielversprechendes Feld in der pharmakologischen Forschung und womöglich auch im therapeutischen Spektrum bei skelettmuskulären Erkrankungen und strukturellen Herzerkrankungen bieten.

4.5 Therapeutische Deduktionen im Hinblick auf körperliches *Training*

Während Titin-Signalweg-basierte Therapien ein bisher rein theoretisches Feld sind, gibt es einige Therapieoptionen, die bei der Sarkopenie etabliert sind. Die beste Wirkung zeigt bislang ein körperliches *Training*, das durch eine hochkalorische Nahrungszufuhr ergänzt werden kann (489). Auch einige pharmakologische Ansätze auf in dieser Arbeit aufgeführten Signalwegen führen zu einem therapeutischen Nutzen und sollen hier zusammenfassend erläutert werden.

Die Erkenntnis, dass ein körperliches *Training* bzw. Physiotherapie den Krankheitsverlauf der Sarkopenie mit und ohne Herzinsuffizienz verbessern kann, wirkt zunächst nicht überraschend. Sie ist aber vor dem Hintergrund, dass die Sarkopenie einen limitierenden Faktor für das Patientenüberleben bei der Herzinsuffizienz darstellt, von höchster Wichtigkeit.

Gleichzeitig belegt die Wirksamkeit des körperlichen Trainings eine einfache und dennoch vielversprechende Tatsache: Die mechanosensitive Muskeltrophie-Regulation bleibt trotz der Sarkopenie intakt. Dies unterstreicht in Anbetracht der Diskussion des vorausgegangenen Kapitels, die Relevanz und den vielversprechenden therapeutischen Nutzen, eines möglichen Eingriffs in diese Regulationsmechanismen. Titin ist durch seine Lage, Struktur und seine Interaktionen ein vielversprechender Kandidat, darin eine entscheidende Rolle zu spielen.

Für eine Beteiligung von Titin an der Wirksamkeit körperlichen Trainings spricht seine deutliche Regulation im Rahmen dessen.

Der Titingehalt eines Muskels ist trainingsabhängig modellierbar. So kommt es 24 Stunden nach einem Widerstands-Training bei Gesunden zu einer deutlichen Reduktion des Titingehaltes um 30% (490). In diesem Zusammenhang konnte auch eine vermehrte Titindegredationsbande (T2) als Zeichen eines gesteigerten Titin Ab- und Umbaus beobachtet werden (491). Durch ein Ausdauertraining zeigte sich im Mausmodell der Titingehalt erhöht (492). Ob hierbei die mRNA-Konzentration erhöht ist oder konstant bleibt ist unklar (26, 492). Interessanterweise scheint dieser Effekt von der aktiven Muskelkontraktion abhängig zu sein. Denn eine Muskellähmung mit Botulinumtoxin führt zwar auch zu einer reduzierten Titinmenge, jedoch lässt sich diese Reduktion nicht durch körperliches *Training* hemmen (493). Da bei einer extern oder durch andere Muskeln ausgelösten Bewegung das Sarkomer sich vermeintlich nicht analog zu einer echten Kontraktion zusammenzieht, korrespondiert dieses Ergebnis gut mit der Vermutung, dass die mechanosensitive Titinmodulation direkt am Sarkomer ausgelöst wird.

Auch die Titinphosphorylierung wird wesentlich beeinträchtigt. Im Skelettmuskel führt körperliches *Training* in der PEVK-Region zu einer erhöhten Serin 12022-Phosphorylierung während die von Serin 11878 reduziert wird. Diese Beobachtung ließ sich nicht durch eine veränderte PKC α -Aktivität erklären (491, 494). Ein Einfluss der mechanischen Beanspruchung des Muskels auf die Titinphosphorylierung und damit vermeintlich die Titinsteifigkeit ließe sich als *Feedback*-Signalweg verstehen. So wäre die Mechanik selbst nicht nur an der Steuerung der Aktivität titinabhängiger Signalwege beteiligt, sondern würde selbst mitwirken, die Empfindlichkeit des Mechanosensors anzupassen.

Gestützt wird diese Theorie auch dadurch, dass die titinabhängigen Signalwege in ihrer Aktivität durch körperliches *Training* beeinflusst werden. Es kommt zu einer erhöhten MLP, CARP, Ankrd2 und Calpain-Expression (26). Gleichzeitig wird die bei Herzinsuffizienz im Skelettmuskel erhöhte Ubiquitin-Proteasom-Aktivität und MuRF1-Expression reduziert (171, 495). Es wird also deutlich, dass eine vermeintliche Titin-Muskeltrophie-Stellschraube durch körperliches *Training* direkt adressiert werden kann, und bisher die erfolgreichsten therapeutischen Ansätze über mechanosensible Signalwege zur Wirkung kommen.

Interessant ist zudem der Befund, dass körperliche Aktivität bei Herzinsuffizienz die im Skelettmuskel erhöhte Myostatin-Konzentration auf ein normwertiges Niveau reduziert (120, 150). Da es durch inflammatorische Signalstoffe oder aber die Angiotensin-Achse induziert wird (120, 157, 158), könnten auch diese durch körperliches *Training* beeinträchtigt werden.

Eine reduzierte Aktivität des Myostatin-Signalweges könnte eine Hemmung der adrenergen Stimulation an der Muskulatur und eine Steigerung der AMPK-Aktivität nach sich ziehen (82, 83, 153, 154). Gleichzeitig könnte der Wegfall seines stimulierenden Einflusses auf das Ubiquitin-Proteasom-System (83, 84) die langfristige Erhöhung des skelettmuskulären Titingehaltes mitvermitteln.

Tatsächlich wird nach körperlichem *Training* auch eine vermehrte AMPK-Aktivität und Proteinsynthese im Skelettmuskel beobachtet (496, 497). Dieser Effekt scheint bei Patienten mit metabolischem Syndrom eingeschränkt zu sein. Hier zeigt sich nach einem körperlichen *Training* eine reduzierte AMPK-Aktivierung (498).

Bei körperlicher Aktivität kommt es bei der Herzinsuffizienz zudem wieder zu einem höheren Anteil an langsam, oxidativen Typ I Fasern (499). Dies geht einher mit einer vermehrten PGC1 α -Expression,

die bekanntermaßen die oxidative Kapazität von Muskelfasern erhöht (192, 500, 501). Zudem hat es insgesamt einen hypertrophen Effekt auf die Muskulatur bei einem hemmenden Effekt auf die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (192, 232, 247). Es verändert das Calcium-Signaling, sodass es zu insgesamt erhöhten intrazellulären Spiegeln kommt (249), was seinerseits die calciumabhängigen Signalwege beeinflussen könnte. Dies könnte die oben beschriebenen Veränderungen in der Titinphosphorylierung nach körperlichem *Training* erklären. Zudem würde dieser Signalweg ebenfalls die Bildung von Typ I-Fasern fördern (206–208).

Widersprüchlich erscheint der Zusammenhang der Fasertypen und MARP-Expression. Während eine vermehrte Bildung von Typ I-Fasern durch körperliches *Training* beschrieben wird, wird gleichzeitig von einer gesteigerten Expression von MARP berichtet (499, 502). Diese induzieren jedoch bekanntermaßen MyoD, einen Transkriptionsfaktor, der die Bildung von schnellen, glykolytischen Muskelfasertypen anregt (244–246). Es scheint also, dass man entweder die Gruppe der MARP differenzierter betrachten muss, und der Einfluss eines einzelnen Mitglieds dieser Gruppe auf die Fasertypenexpression unterschiedlich sein kann, oder aber dass der hypertrophe Effekt den Fasertypen verändernden Effekt überwiegt, und somit auch die Bildung von schnellen, glykolytischen Fasern angeregt wird, wenn auch nicht im gleichen Maße wie die der langsam Oxidativen.

Interessanterweise fällt zudem bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II die Steigerung der MARP-Expression im Skelettmuskel geringer aus, als bei gesunden Probanden (502). Betrachtet man auch diesen Befund vor dem Hintergrund einer möglichen Titin-Muskeltrophie-Stellschraube, könnte dies das klinische Korrelat der beobachteten mechanischen Veränderungen von Titin bei dBdB *sham*-Tieren darstellen.

Für die ursprüngliche Verschiebung der Fasertypen bei Herzinsuffizienz scheint die Angiotensin-Achse von entscheidender Bedeutung zu sein (119). Eine vermeintliche Korrektur dieser, könnte also auch die Normalisierung der Myostatin Spiegel erklären. Auch sein hemmender Einfluss auf die IGF-1-Expression scheint durch körperliches *Training* wegzufallen (81, 162, 503).

Wenn es durch körperliches *Training* also zu einer Normalisierung der bei Herzinsuffizienz beeinträchtigten Angiotensin-Achse kommt, würde dies vermeintlich die skelettmuskuläre Stoffwechselfunktion verbessern und durch eine wegfallende Stimulation der Ubiquitin-Proteasom-Aktivität (81, 161–163) auch das Titin-Signaling vermeintlich näher an eine physiologische Aktivität bewegen.

Für den Einfluss der Angiotensin-Achse spricht auch, dass die in der Herzinsuffizienz gut etablierte pharmakologische Hemmung dieser Achse auch eine therapeutische Wirkung auf die Sarkopenie aufweist. Es reduziert die Muskelatrophie und den Gewichtsverlust bei Herzinsuffizienzpatienten und reduziert gleichzeitig auch die herzinsuffizienztypischen Veränderungen im oxidativen Phänotyp der Muskelzellen (61, 119). Interessanterweise ist in diesem Rahmen beobachtet worden, dass Verapamil die Translokation von MLP in den skelettmuskulären Zellkern hemmt (28), wobei bekannt ist, dass es bei Herzinsuffizienz normalerweise vermehrt in den Zellkern migriert (27).

Auch wenn MLP physiologischerweise das Sarkomer-*Remodeling* in Antwort auf hypertrophe Stimuli reguliert (26–28, 377), könnte ein fehlreguliertes *Remodeling* atrophiefördernd wirken. Wenn die Aktivierung durch die Titinmodifikation pathologisch verändert ist, könnte ein gesteigerter sarkomerdegradierender Effekt zustande kommen, und erklären, warum eine Hemmung der Angiotensinachse auf diesem Weg protektiv auf die Muskelzellstruktur wirkt. Auch den Einfluss der Hemmung der Angiotensinachse auf die Fasertypenregulation, könnte teilweise auf die Wirkung von MLP zurückgehen, da dieses an der Fasertypenregulation beteiligt und bei Herzinsuffizienz verändert ist (27, 385, 388, 389)

Vor diesem Hintergrund könnte die therapeutische Wirksamkeit eines körperlichen Trainings also auf eine Rekrutierung mechanosensitiver Signalwege im Skelettmuskel zurückzuführen sein, die Kaskaden in Gang setzen, die letztlich wieder die mechanosensitiven Signalwege beeinflussen. Wird deren prohypertrophe Wirksamkeit auf diesem Wege im Sinne eines positiven *Feedback*-Mechanismus weiter gesteigert, könnte dies den Muskelstoffwechsel zunehmend normalisieren. Dies

gilt scheinbar auch noch dann, wenn durch eine vorausgehende Titinversteifung das Ausmaß des Effektes limitiert wird.

4.6 Ausblick

Insgesamt hat sich also im Rahmen der Untersuchung der Muskelschwäche bei Herzkrankheit ein spannender Einblick in die komplexregulierte Titinmechanik ergeben, die vermeintlich ihrerseits einen bedeutenden Einfluss auf den Muskelzellstoffwechsel und die Muskelfunktion nimmt.

Es zeigte sich eine bei dBdB-Tieren gegenüber dB+ teilweise erhöhte passive Muskelkraft und eine Steigerung der passiven und aktiven Muskelkraft nach *IR*, die bei dB+ ausgeprägter war als bei dBdB und sich zwischen den betrachteten unterschiedlichen Muskeln unterschied. Ein analoges Bild zu der aktiven Muskelkraft ergab sich bei der Betrachtung der maximalen aktiven Kraft unter Vordehnung. Auch die skelettmuskuläre Calciumsensitivität zeigte sich nach *IR* in dB+ und dBdB teilweise signifikant erhöht.

Biochemisch zeigte sich die Titinexpression bei dBdB-Tieren gegenüber dB+ teilweise signifikant reduziert. Auch nach *IR* kam es teilweise zu einer signifikanten Reduktion der Titinexpression. Bei dBdB kam es im Vergleich zu dB+-Tieren zu einer Reduktion der PKC α -Phosphorylierung. Diese war auch nach *IR* sowohl bei dB+ als auch bei dBdB reduziert. Die Expression der AMPK zeigte sich nach *IR* bei dBdB je nach Skelettmuskel teilweise gesteigert und teilweise reduziert.

Wenn sich die hier postulierte Integratorfunktion mechanischer und biochemischer Einfluss in komplexer Verrechnung über das Titinprotein und davon abhängigen Signalfunktionen belegen ließe, würde dies ein spannendes Feld in der Forschung eröffnen. Einerseits wäre davon auszugehen, dass sich die Erkenntnisse einer Vielzahl von Mechanismen, von denen in dieser Arbeit nur ein Teil dargestellt werden konnte, über einen gemeinsamen integrativen Mechanismus an Titin von unterschiedlichen skelett- und herzmuskulären Pathologien aufeinander übertragen ließen. Gleichzeitig böte es aber auch ein Feld für neue therapeutische Optionen und eine völlig neue Zielstruktur pharmakologischer Forschung in einem großen Spektrum von Pathologien. Auch ein Einsatz bekannter Substanzen mit Wirkung auf titininteragierende Signalwege könnte in einem neuen Krankheitsspektrum untersucht werden.

Zunächst müsste aber der Mechanismus selbst experimentell belegt und weiter untersucht werden. Zu klären sind die Fragen, inwiefern Modifikationen der Titinmechanik die titinabhängigen Signalwege beeinflussen, und ob sich womöglich regulative *Feedback*-Mechanismen einstellen, wie sie aus anderen Systemen bekannt sind. Vor diesen Ergebnissen könnte dann die Frage verfolgt werden, bei welchen Pathologien und inwiefern die Modifikation des Titin-*Signalings* den muskulären Zellstoffwechsel beeinflusst. Daraus böte sich dann die letzte und spannendste konsekutive Frage: Was können wir tun, um derartige pathologische Veränderungen zu vermindern oder gar einen manipulativen Einfluss auf das Titin-*Signaling* zum Patientenvorteil zu nutzen? Auch wenn wie oben dargestellt das körperliche *Training* eine grundsätzlich interessante Möglichkeit bietet, weist es viele Nachteile in seiner praktischen Umsetzbarkeit auf. Es ist intensiv von der Patienten-*Compliance* abhängig und vom Ablauf her so komplex, dass sich eine Standardisierung sehr schwierig darstellt. Zudem ist im Patientenkollektiv mit sarkopenischen Veränderungen von einer deutlichen Schwierigkeit in der Umsetzung eines körperlichen Trainings auszugehen. Einerseits wegen der Muskelschwäche selbst und andererseits wegen leistungslimitierender Begleitpathologien. Hier wäre also ein pharmakologischer Eingriff aufgrund seiner guten Steuerbarkeit und Vergleichbarkeit ein sehr vielversprechender Ansatz.

Gleichzeitig muss jedoch auch die mechanische Funktion von Titin im Auge behalten werden. Im frühen Untersuchungszeitraum dieser Arbeit zeigte sich eine Titinversteifung bei gesteigerter aktiver Muskelkraft nach *IR*. Dies kann natürlich nicht als repräsentativ für den gesamten Krankheitsverlauf angesehen werden, zumal bekannterweise später mit einer verminderten Muskelkraft zu rechnen wäre. Dies wirft die interessante Frage auf, wie sich die Titinmechanik im Skelettmuskel im Verlauf nach *IR* entwickelt. Wann überwiegt die Muskelschwäche und bis wann ist eine vermeintliche Kompensation

über Titin wirksam? Die Kenntnis der Dynamik dieser Veränderungen könnte entscheidend zum Verständnis der beteiligten Signalwege beitragen.

Derartige Überlegungen sind auch für die obigen Fragestellungen interessant, da ein Eingriff an Titin eben nicht nur eine Beeinflussung seiner Stoffwechselfunktion erwarten lässt, sondern gleichzeitig auch eine Modifikation der Muskelmechanik bedeuten könnte. Es ist offensichtlich, dass die Stabilität und Funktionsfähigkeit des Sarkomers in der Muskelfunktion zu jeden Zeitpunkt gewährleistet werden muss.

Zudem konnten die Einflüsse, die zur Titinversteifung führen im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend experimentell ergründet werden. Bei der hohen Signifikanz der Ergebnisse, sind aber zweifelsfrei veränderte titinmodifizierende Signalwege zu erwarten. Vor den Befunden dieser und anderer Arbeiten, erscheint die Betrachtung von *Heat shock* Proteinen und Chaperonen, aber auch der CamKII sinnvoll, aber natürlich ist auch eine Beteiligung anderer bekannter oder sogar unbekannter titinmodifizierender Signalwege denkbar. Auch Veränderungen in der Fasertypenexpression könnten die Befunde zum Teil erklären und bieten Raum für eine weitergehende Untersuchung. Da deren Regulation wie in der Einleitung dargestellt überaus komplex ist, wäre auch hier eine Betrachtung über den zeitlichen Verlauf besonders interessant.

Zur weiteren Evaluation des Einflusses der metabolischen Veränderungen bei einem Diabetes mellitus insbesondere vor dem Hintergrund eines Herzinfarktes erscheint die Betrachtung der Beeinträchtigung unterschiedlicher Signalwege vor diesem Hintergrund sinnvoll, so etwa die Beeinträchtigung der GH-IGF1-Achse, des Apelinpiegels, des Myostatin-Signalweges, der Angiotensin-Achse und systemischer Entzündungsreaktionen- einerseits in der Basalfunktion und dann im Vergleich dazu nach *IR*.

Selbst wenn sich die in dieser Arbeit aufgestellten Thesen über die möglichen Ursachen und Konsequenzen der veränderten Titinmechanik nicht bestätigen lassen sollten, bleibt die hier beschriebene veränderte Mechanik des Skelettmuskels nach *IR* signifikant und interessant. Die Aufklärung dieser Geheimnisse, ob sie sich nun in den Tiefen der Muskelphysiologie oder andernorts finden lassen wird, kann mit Spannung erwartet werden.

5 Literatur

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2017; 135(10):e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.
2. Dunlay SM, Weston SA, Jacobsen SJ, Roger VL. Risk factors for heart failure: a population-based case-control study. *Am J Med* 2009; 122(11):1023–8. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.04.022.
3. Fülster S, Tacke M, Sandek A, Ebner N, Tschöpe C, Doehner W et al. Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *Eur Heart J* 2013; 34(7):512–9. doi: 10.1093/eurheartj/ehs381.
4. Mancini DM, Walter G, Reichek N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation* 1992; 85(4):1364–73. doi: 10.1161/01.cir.85.4.1364.
5. Linke WA, Ivemeyer M, Labeit S, Hinssen H, Rüegg JC, Gautel M. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophysical Journal* 1997; 73(2):905–19. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78123-2.
6. Funatsu T, Higuchi H, Ishiwata S. Elastic filaments in skeletal muscle revealed by selective removal of thin filaments with plasma gelsolin. *J Cell Biol* 1990; 110(1):53–62. doi: 10.1083/jcb.110.1.53.
7. Prado LG, Makarenko I, Andresen C, Krüger M, Opitz CA, Linke WA. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol* 2005; 126(5):461–80. doi: 10.1085/jgp.200509364.
8. Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophysical Journal* 1995; 68(3):1027–44. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80278-X.
9. Cowie CC, Rust KF, Ford ES, Eberhardt MS, Byrd-Holt DD, Li C et al. Full accounting of diabetes and pre-diabetes in the U.S. population in 1988-1994 and 2005-2006. *Diabetes care* 2009; 32(2):287–94. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19017771/>.
10. Park SW, Goodpaster BH, Strotmeyer ES, Rekeire N de, Harris TB, Schwartz AV et al. Decreased muscle strength and quality in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes* 2006; 55(6):1813–8. doi: 10.2337/db05-1183.
11. Doehner W, Turhan G, Leyva F, Rauchhaus M, Sandek A, Jankowska EA et al. Skeletal muscle weakness is related to insulin resistance in patients with chronic heart failure. *ESC Heart Failure* 2015; 2(2):85–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28834658/>.
12. Wang J, Liu X, Arneja AS, Dhalla NS. Alterations in protein kinase A and protein kinase C levels in heart failure due to genetic cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 1999; 15(6):683–90.
13. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ et al. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res* 2007; 101(2):195–204. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.148288.
14. Kötter S, Gout L, Frieling-Salewsky M von, Müller AE, Helling S, Marcus K

- et al. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 2013; 99(4):648–56. doi: 10.1093/cvr/cvt144.
15. Hudson B, Hidalgo C, Saripalli C, Granzier H. Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction. *Circ Res* 2011; 109(8):858–66. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246819.
 16. Hudson BD, Hidalgo CG, Gotthardt M, Granzier HL. Excision of titin's cardiac PEVK spring element abolishes PKC α -induced increases in myocardial stiffness. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48(5):972–8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.12.006.
 17. Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M et al. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 2009; 105(7):631–8, 17 p following 638. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.198465.
 18. Terui T, Sodnomtseren M, Matsuba D, Udaka J, Ishiwata S, Ohtsuki I et al. Troponin and titin coordinately regulate length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle. *J Gen Physiol* 2008; 131(3):275–83. doi: 10.1085/jgp.200709895.
 19. Fabiato A, Fabiato F. Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells. *J Gen Physiol* 1978; 72(5):667–99. doi: 10.1085/jgp.72.5.667.
 20. Ait-Mou Y, Hsu K, Farman GP, Kumar M, Greaser ML, Irving TC et al. Titin strain contributes to the Frank-Starling law of the heart by structural rearrangements of both thin- and thick-filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(8):2306–11. doi: 10.1073/pnas.1516732113.
 21. Cazorla O, Wu Y, Irving TC, Granzier H. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res* 2001; 88(10):1028–35. doi: 10.1161/hh1001.090876.
 22. Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* 1997; 124(4):793–804.
 23. Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Belgrano A, Stankovic M, Divac A et al. A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Arch Biochem Biophys* 2010; 502(1):60–7. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.029.
 24. Laure L, Danièle N, Suel L, Marchand S, Aubert S, Bourg N et al. A new pathway encompassing calpain 3 and its newly identified substrate cardiac ankyrin repeat protein is involved in the regulation of the nuclear factor- κ B pathway in skeletal muscle. *FEBS J* 2010; 277(20):4322–37. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07820.x.
 25. Miller MK, Bang M-L, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K et al. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 2003; 333(5):951–64. doi: 10.1016/j.jmb.2003.09.012.
 26. Lehti M, Kivelä R, Komi P, Komulainen J, Kainulainen H, Kyröläinen H. Effects of fatiguing jumping exercise on mRNA expression of titin-complex proteins and calpains. *J Appl Physiol* (1985) 2009; 106(4):1419–24. doi: 10.1152/jappphysiol.90660.2008.
 27. Boateng SY, Belin RJ, Geenen DL, Margulies KB, Martin JL, Hoshijima M et al. Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. *Am J Physiol*

- Heart Circ Physiol 2007; 292(1):H259-69. doi: 10.1152/ajpheart.00766.2006.
28. Boateng SY, Senyo SE, Qi L, Goldspink PH, Russell B. Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47(4):426–35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.04.006.
 29. Heineke J, Ruetten H, Willenbockel C, Gross SC, Naguib M, Schaefer A et al. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(5):1655–60. doi: 10.1073/pnas.0405488102.
 30. Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang M-L et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002; 111(7):943–55. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01226-6.
 31. Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E et al. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 2005; 308(5728):1599–603. doi: 10.1126/science.1110463.
 32. Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* 2001; 306(4):717–26. doi: 10.1006/jmbi.2001.4448.
 33. Bowen TS, Adams V, Werner S, Fischer T, Vinke P, Brogger MN et al. Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(6):939–53. doi: 10.1002/jcsm.12233.
 34. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S et al. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res* 2016; 119(9):1017–29. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309685.
 35. Platz E, Jhund PS, Claggett BL, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB et al. Prevalence and prognostic importance of precipitating factors leading to heart failure hospitalization: recurrent hospitalizations and mortality. *European Journal of Heart Failure* 2018; 20(2):295–303. doi: 10.1002/ejhf.901.
 36. Al-Omary MS, Khan AA, Davies AJ, Fletcher PJ, Mcivior D, Bastian B et al. Outcomes following heart failure hospitalization in a regional Australian setting between 2005 and 2014. *ESC Heart Failure* 2018; 5(2):271–8. doi: 10.1002/ehf2.12239.
 37. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review* 2017; 03(01):7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28785469/>.
 38. Haehling S von. Co-morbidities in heart failure beginning to sprout-and no end in sight? *European Journal of Heart Failure* 2017; 19(12):1566–8. doi: 10.1002/ejhf.1098.
 39. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 2012; 380(9859):2095–128. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0.
 40. Konishi M, Ishida J, Springer J, Haehling S von, Akashi YJ, Shimokawa H et al. Heart failure epidemiology and novel treatments in Japan: facts and numbers. *ESC Heart Failure* 2016; 3(3):145–51. doi: 10.1002/ehf2.12103.
 41. Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, Bluemke DA, Butler J, Fonarow GC et

- al. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail* 2013; 6(3):606–19. doi: 10.1161/HHF.0b013e318291329a.
42. Ohlmeier C, Mikolajczyk R, Frick J, Prütz F, Haverkamp W, Garbe E. Incidence, prevalence and 1-year all-cause mortality of heart failure in Germany: a study based on electronic healthcare data of more than six million persons. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2015; 104(8):688–96. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25777937/>.
43. Kleiner Shochat M, Fudim M, Shotan A, Blondheim DS, Kazatsker M, Dahan I et al. Prediction of readmissions and mortality in patients with heart failure: lessons from the IMPEDANCE-HF extended trial. *ESC Heart Failure* 2018; 5(5):788–99. doi: 10.1002/ehf2.12330.
44. Riley JP, Beattie JM. Palliative care in heart failure: facts and numbers. *ESC Heart Failure* 2017; 4(2):81–7. doi: 10.1002/ehf2.12125.
45. Zelenak C, Radenovic S, Musial-Bright L, Tahirovic E, Sacirovic M, Lee C-B et al. Heart failure awareness survey in Germany: general knowledge on heart failure remains poor. *ESC Heart Failure* 2017; 4(3):224–31. doi: 10.1002/ehf2.12144.
46. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010; 39(4):412–23. doi: 10.1093/ageing/afq034.
47. Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American journal of epidemiology* 1998; 147(8):755–63. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9554417/>.
48. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50(5):889–96. doi: 10.1046/j.1532-5415.2002.50216.x.
49. Rolland Y, Lauwers-Cances V, Cournot M, Nourhashemi F, Reynish W, Rivièrè D et al. Sarcopenia, calf circumference, and physical function of elderly women: a cross-sectional study. *J Am Geriatr Soc* 2003; 51(8):1120–4. doi: 10.1046/j.1532-5415.2003.51362.x.
50. Lauretani F, Russo CR, Bandinelli S, Bartali B, Cavazzini C, Di Iorio A et al. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl Physiol* (1985) 2003; 95(5):1851–60. doi: 10.1152/jappphysiol.00246.2003.
51. Barbosa-Silva TG, Bielemann RM, Gonzalez MC, Menezes AMB. Prevalence of sarcopenia among community-dwelling elderly of a medium-sized South American city: results of the COMO VAI? study. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2016; 7(2):136–43. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27493867/>.
52. Dodds RM, Granic A, Davies K, Kirkwood TBL, Jagger C, Sayer AA. Prevalence and incidence of sarcopenia in the very old: findings from the Newcastle 85+ Study. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(2):229–37. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27897431/>.
53. Anker SD, Morley JE, Haehling S von. Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2016; 7(5):512–4. doi: 10.1002/jcsm.12147.

54. Landi F, Liperoti R, Russo A, Giovannini S, Tosato M, Barillaro C et al. Association of anorexia with sarcopenia in a community-dwelling elderly population: results from the ilSIRENTE study. *Eur J Nutr* 2013; 52(3):1261–8. doi: 10.1007/s00394-012-0437-y.
55. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011; 12(5):489–95. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70218-7.
56. Hajahmadi M, Shemshadi S, Khalilipour E, Amin A, Taghavi S, Maleki M et al. Muscle wasting in young patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(4):542–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28251827/>.
57. Bekfani T, Pellicori P, Morris DA, Ebner N, Valentova M, Steinbeck L et al. Sarcopenia in patients with heart failure with preserved ejection fraction: Impact on muscle strength, exercise capacity and quality of life. *International Journal of Cardiology* 2016; 222:41–6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27454614/>.
58. Saitoh M, Dos Santos MR, Emami A, Ishida J, Ebner N, Valentova M et al. Anorexia, functional capacity, and clinical outcome in patients with chronic heart failure: results from the Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure (SICA-HF). *ESC Heart Failure* 2017; 4(4):448–57. doi: 10.1002/ehf2.12209.
59. Malmstrom TK, Miller DK, Simonsick EM, Ferrucci L, Morley JE. SARC-F: a symptom score to predict persons with sarcopenia at risk for poor functional outcomes. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2016; 7(1):28–36. doi: 10.1002/jcsm.12048.
60. Brown JC, Harhay MO, Harhay MN. Sarcopenia and mortality among a population-based sample of community-dwelling older adults. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2016; 7(3):290–8. doi: 10.1002/jcsm.12073.
61. Anker SD, Negassa A, Coats AJS, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *The Lancet* 2003; 361(9363):1077–83. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12892-9.
62. Emami A, Saitoh M, Valentova M, Sandek A, Evertz R, Ebner N et al. Comparison of sarcopenia and cachexia in men with chronic heart failure: results from the Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure (SICA-HF). *European Journal of Heart Failure* 2018; 20(11):1580–7. doi: 10.1002/ejhf.1304.
63. Malmstrom TK, Miller DK, Herning MM, Morley JE. Low appendicular skeletal muscle mass (ASM) with limited mobility and poor health outcomes in middle-aged African Americans. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2013; 4(3):179–86. doi: 10.1007/s13539-013-0106-x.
64. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM et al. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *The Lancet* 1997; 349(9058):1050–3. doi: 10.1016/S0140-6736(96)07015-8.
65. Yang M, Hu X, Wang H, Zhang L, Hao Q, Dong B. Sarcopenia predicts readmission and mortality in elderly patients in acute care wards: a prospective study. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(2):251–8. doi: 10.1002/jcsm.12163.
66. Janssen I. Influence of sarcopenia on the development of physical disability: the Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54(1):56–62. doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.00540.x.

67. Abe T, Thiebaud RS, Loenneke JP, Bembien MG, Loftin M, Fukunaga T. Influence of severe sarcopenia on cardiovascular risk factors in nonobese men. *Metabolic syndrome and related disorders* 2012; 10(6):407–12. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22816600/>.
68. Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV et al. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61(10):1059–64. doi: 10.1093/gerona/61.10.1059.
69. Versteeg KS, Blauwhoff-Buskermolen S, Buffart LM, van der Schueren MAE de, Langius JAE, Verheul HMW et al. Higher Muscle Strength Is Associated with Prolonged Survival in Older Patients with Advanced Cancer. *Oncologist* 2018; 23(5):580–5. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0193.
70. Narumi T, Watanabe T, Kadowaki S, Takahashi T, Yokoyama M, Kinoshita D et al. Sarcopenia evaluated by fat-free mass index is an important prognostic factor in patients with chronic heart failure. *Eur J Intern Med* 2015; 26(2):118–22. doi: 10.1016/j.ejim.2015.01.008.
71. Ohta Y, Kinugawa S, Matsushima S, Ono T, Sobirin MA, Inoue N et al. Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300(5):H1637–44. doi: 10.1152/ajpheart.01185.2009.
72. Kemppainen J, Tsuchida H, Stolen K, Karlsson H, Björnholm M, Heinonen OJ et al. Insulin signalling and resistance in patients with chronic heart failure. *J Physiol* 2003; 550(Pt 1):305–15. doi: 10.1113/jphysiol.2003.042648.
73. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3(11):1009–13. doi: 10.1038/ncb1101-1009.
74. Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, Marciniak T, Yeoh T, Allen DG et al. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 1999; 400(6744):576–81. doi: 10.1038/23054.
75. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001; 104(17):2034–8. doi: 10.1161/hc4201.097836.
76. Doehner W, Pflaum CD, Rauchhaus M, Godtsland IF, Egerer K, Ciccoira M et al. Leptin, insulin sensitivity and growth hormone binding protein in chronic heart failure with and without cardiac cachexia. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(6):727–35. doi: 10.1530/eje.0.1450727.
77. Dattani MT, Hindmarsh PC, Brook CG, Robinson IC, Marshall NJ. Inhibition of growth hormone bioactivity by recombinant human growth hormone-binding protein in the eluted stain assay system. *J Endocrinol* 1994; 140(3):445–53. doi: 10.1677/joe.0.1400445.
78. Schulze PC, Fang J, Kassik KA, Gannon J, Cupesi M, MacGillivray C et al. Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. *Circ Res* 2005; 97(5):418–26. doi: 10.1161/01.RES.0000179580.72375.c2.
79. Shyu K-G, Ko W-H, Yang W-S, Wang B-W, Kuan P. Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005; 68(3):405–14. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.06.028.

80. Romero CJ, Pine-Twaddell E, Sima DI, Miller RS, He L, Wondisford F et al. Insulin-like growth factor 1 mediates negative feedback to somatotroph GH expression via POU1F1/CREB binding protein interactions. *Mol Cell Biol* 2012; 32(21):4258–69. doi: 10.1128/MCB.00171-12.
81. Brink M, Wellen J, Delafontaine P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J Clin Invest* 1996; 97(11):2509–16. doi: 10.1172/JCI118698.
82. Morissette MR, Cook SA, Foo S, McKoy G, Ashida N, Novikov M et al. Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ Res* 2006; 99(1):15–24. doi: 10.1161/01.RES.0000231290.45676.d4
83. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2006; 209(2):501–14. doi: 10.1002/jcp.20757.
84. Castellero E, Akashi H, Wang C, Najjar M, Ji R, Kennel PJ et al. Cardiac myostatin upregulation occurs immediately after myocardial ischemia and is involved in skeletal muscle activation of atrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 457(1):106–11. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.057.
85. Christensen HM, Kistorp C, Schou M, Keller N, Zerahn B, Frystyk J et al. Prevalence of cachexia in chronic heart failure and characteristics of body composition and metabolic status. *Endocrine* 2013; 43(3):626–34. doi: 10.1007/s12020-012-9836-3.
86. Saitoh M, Dos Santos MR, Ebner N, Emami A, Konishi M, Ishida J et al. Nutritional status and its effects on muscle wasting in patients with chronic heart failure: insights from Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure. *Wien Klin Wochenschr* 2016; 128(Suppl 7):497–504. doi: 10.1007/s00508-016-1112-8.
87. Goossens C, Marques MB, Derde S, Vander Perre S, Dufour T, Thiessen SE et al. Premorbid obesity, but not nutrition, prevents critical illness-induced muscle wasting and weakness. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(1):89–101. doi: 10.1002/jcsm.12131.
88. Baumgartner RN, Waters DL, Gallagher D, Morley JE, Garry PJ. Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mech Ageing Dev* 1999; 107(2):123–36. doi: 10.1016/s0047-6374(98)00130-4.
89. Kistorp C, Faber J, Galatius S, Gustafsson F, Frystyk J, Flyvbjerg A et al. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005; 112(12):1756–62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.530972.
90. Djoussé L, Wilk JB, Hanson NQ, Glynn RJ, Tsai MY, Gaziano JM. Association between adiponectin and heart failure risk in the physicians' health study. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21(4):831–4. doi: 10.1002/oby.20260.
91. Szabó T, Scherbakov N, Sandek A, Kung T, Haehling S von, Lainscak M et al. Plasma adiponectin in heart failure with and without cachexia: catabolic signal linking catabolism, symptomatic status, and prognosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24(1):50–6. doi: 10.1016/j.numecd.2013.04.015.
92. Choudhary S, Sinha S, Zhao Y, Banerjee S, Sathyanarayana P, Shahani S et al. NF-kappaB-inducing kinase (NIK) mediates skeletal muscle insulin resistance: blockade by adiponectin. *Endocrinology* 2011; 152(10):3622–7. doi: 10.1210/en.2011-1343.

93. Li C-W, Yu K, Shyh-Chang N, Li G-X, Jiang L-J, Yu S-L et al. Circulating factors associated with sarcopenia during ageing and after intensive lifestyle intervention. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2019; 10(3):586–600. doi: 10.1002/jcsm.12417.
94. Palus S, Schur R, Akashi YJ, Bockmeyer B, Datta R, Halem H et al. Ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28125, improve body weight and regulate the expression of MuRF-1 and MAFbx in a rat heart failure model. *PLoS One* 2011; 6(11):e26865. doi: 10.1371/journal.pone.0026865.
95. Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L et al. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(1):E228-35. doi: 10.1152/ajpendo.00115.2004.
96. Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Palus S, Vinci P, Ruozi G, Zanetti M et al. Acylated ghrelin treatment normalizes skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity and AKT phosphorylation in rat chronic heart failure. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(6):991–8. doi: 10.1002/jcsm.12254.
97. Temel JS, Abernethy AP, Curott DC, Friend J, Duus EM, Yan Y et al. Anamorelin in patients with non-small-cell lung cancer and cachexia (ROMANA 1 and ROMANA 2): results from two randomised, double-blind, phase 3 trials. *The Lancet Oncology* 2016; 17(4):519–31. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00558-6.
98. Curott D, Temel JS, Abernethy A, Milanowski J, Friend J, Fearon KC. ROMANA 3: a phase 3 safety extension study of anamorelin in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with cachexia. *Ann Oncol* 2017; 28(8):1949–56. doi: 10.1093/annonc/mdx192.
99. Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 1996; 97(9):2152–7. doi: 10.1172/JCI118653.
100. Morley JE, Alshaher MM, Farr SA, Flood JF, Kumar VB. Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides* 1999; 20(5):595–600. doi: 10.1016/s0196-9781(99)00012-1.
101. Morley JE, Miller DK, Perry HM, Patrick P, Guigoz Y, Vellas B. Anorexia of aging, leptin, and the Mini Nutritional Assessment. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 1999; 1:67-76; discussion 77. doi: 10.1159/000062949.
102. Perry HM, Morley JE, Horowitz M, Kaiser FE, Miller DK, Wittert G. Body composition and age in african-american and caucasian women: Relationship to plasma leptin levels. *Metabolism* 1997; 46(12):1399–405. doi: 10.1016/s0026-0495(97)90138-4.
103. Gayle D, Ilyin SE, Plata-Salamán CR. Central nervous system IL-1 beta system and neuropeptide Y mRNAs during IL-1 beta-induced anorexia in rats. *Brain Res Bull* 1997; 44(3):311–7. doi: 10.1016/s0361-9230(97)00159-7.
104. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323(4):236–41. doi: 10.1056/NEJM199007263230405.
105. McMurray J, Abdullah I, Dargie HJ, Shapiro D. Increased concentrations of tumour necrosis factor in "cachectic" patients with severe chronic heart failure. *Br Heart J* 1991; 66(5):356–8. doi: 10.1136/hrt.66.5.356.
106. Chandrasekaran B, Kalra PR, Donovan J, Hooper J, Clague JR, McDonagh TA. Myocardial apelin production is reduced in humans with left ventricular systolic dysfunction. *J Card Fail* 2010; 16(7):556–61. doi: 10.1016/j.cardfail.2010.02.004.

107. Vinel C, Lukjanenko L, Batut A, Deleruyelle S, Pradère J-P, Le Gonidec S et al. The exerkinine apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat Med* 2018; 24(9):1360–71. doi: 10.1038/s41591-018-0131-6.
108. He L, Khanal P, Morse CI, Williams A, Thomis M. Differentially methylated gene patterns between age-matched sarcopenic and non-sarcopenic women. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2019; 10(6):1295–306. doi: 10.1002/jcsm.12478.
109. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004; 18(15):1909–11. doi: 10.1096/fj.04-1930fje.
110. Zhang H, Gong Y, Wang Z, Jiang L, Chen R, Fan X et al. Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PSMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia. *J Cell Mol Med* 2014; 18(3):542–53. doi: 10.1111/jcmm.12208.
111. Yamamoto T, Habata Y, Matsumoto Y, Yasuhara Y, Hashimoto T, Hamajyo H et al. Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810(9):853–62. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.004.
112. Mofarrahi M, McClung JM, Kontos CD, Davis EC, Tappuni B, Moroz N et al. Angiopoietin-1 enhances skeletal muscle regeneration in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015; 308(7):R576-89. doi: 10.1152/ajpregu.00267.2014.
113. Attané C, Daviaud D, Dray C, Dusaulcy R, Masseboeuf M, Prévot D et al. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J Mol Endocrinol* 2011; 46(1):21–8. doi: 10.1677/JME-10-0105.
114. Besse-Patin A, Montastier E, Vinel C, Castan-Laurell I, Louche K, Dray C et al. Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. *Int J Obes (Lond)* 2014; 38(5):707–13. doi: 10.1038/ijo.2013.158.
115. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146(4):1764–71. doi: 10.1210/en.2004-1427.
116. Rai R, Ghosh AK, Eren M, Mackie AR, Levine DC, Kim S-Y et al. Downregulation of the Apelinergic Axis Accelerates Aging, whereas Its Systemic Restoration Improves the Mammalian Healthspan. *Cell Rep* 2017; 21(6):1471–80. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.057.
117. Xie F, Liu W, Feng F, Li X, He L, Lv D et al. Apelin-13 promotes cardiomyocyte hypertrophy via PI3K-Akt-ERK1/2-p70S6K and PI3K-induced autophagy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015; 47(12):969–80. doi: 10.1093/abbs/gmv111.
118. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A et al. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 1995; 92(6):1479–86. doi: 10.1161/01.cir.92.6.1479.
119. Dalla Libera L, Ravara B, Angelini A, Rossini K, Sandri M, Thiene G et al. Beneficial effects on skeletal muscle of the angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation* 2001; 103(17):2195–200. doi: 10.1161/01.cir.103.17.2195.
120. Lenk K, Schur R, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V et al. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *European Journal of*

- Heart Failure 2009; 11(4):342–8. doi: 10.1093/eurjhf/hfp020.
121. Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, Psaty BM, Rodondi N, Smith AL, Harrison DG et al. Inflammatory markers and incident heart failure risk in older adults: the Health ABC (Health, Aging, and Body Composition) study. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 55(19):2129–37. doi: 10.1016/j.jacc.2009.12.045.
 122. Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ et al. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation* 1997; 96(2):526–34. doi: 10.1161/01.cir.96.2.526.
 123. Weinberg EO, Shimpo M, Keulenaer GW de, MacGillivray C, Tominaga S, Solomon SD et al. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106(23):2961–6. doi: 10.1161/01.cir.0000038705.69871.d9.
 124. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Müller F, Andreassen AK et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999; 83(3):376–82. doi: 10.1016/s0002-9149(98)00872-8.
 125. Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau J-L, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation* 2003; 107(5):721–6. doi: 10.1161/01.cir.0000047274.66749.fe.
 126. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J et al. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail* 2009; 2(6):684–91. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.873240.
 127. Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB et al. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57(5):M326–32. doi: 10.1093/gerona/57.5.m326.
 128. Agapitou V, Dimopoulos S, Kapelios C, Karatzanos E, Manetos C, Georgantas A et al. Hormonal imbalance in relation to exercise intolerance and ventilatory inefficiency in chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32(4):431–6. doi: 10.1016/j.healun.2012.12.011.
 129. Lee W-J, Peng L-N, Loh C-H, Chen L-K. Sex-different associations between serum homocysteine, high-sensitivity C-reactive protein and sarcopenia: Results from I-Lan Longitudinal Aging Study. *Exp Gerontol* 2020; 132:110832. doi: 10.1016/j.exger.2020.110832.
 130. Boxer RS, Dauser DA, Walsh SJ, Hager WD, Kenny AM. The association between vitamin D and inflammation with the 6-minute walk and frailty in patients with heart failure. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56(3):454–61. doi: 10.1111/j.1532-5415.2007.01601.x.
 131. Schaap LA, Pluijm SMF, Deeg DJH, Visser M. Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength. *Am J Med* 2006; 119(6):526.e9-17. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.10.049.
 132. Migliavacca E, Tay SKH, Patel HP, Sonntag T, Civiletto G, McFarlane C et al. Mitochondrial oxidative capacity and NAD⁺ biosynthesis are reduced in human sarcopenia across ethnicities. *Nat Commun* 2019; 10(1):5808. doi: 10.1038/s41467-019-13694-1.
 133. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1.

- Nature 1997; 385(6616):540–4. doi: 10.1038/385540a0.
134. Reinhard C, Shyama V, Williams LT. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J* 1997; 16(5):1080–92. doi: 10.1093/emboj/16.5.1080.
 135. Urban RJ, Dillon EL, Choudhary S, Zhao Y, Horstman AM, Tilton RG et al. Translational studies in older men using testosterone to treat sarcopenia. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2014; 125:27-42; discussion 42-4.
 136. Yamaki T, Wu C-L, Gustin M, Lim J, Jackman RW, Kandarian SC. Rel A/p65 is required for cytokine-induced myotube atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 303(2):C135-42. doi: 10.1152/ajpcell.00111.2012.
 137. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006; 55(10):2688–97. doi: 10.2337/db05-1404.
 138. Gullestad L, Aukrust P, Ueland T, Espevik T, Yee G, Vagelos R et al. Effect of high- versus low-dose angiotensin converting enzyme inhibition on cytokine levels in chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 1999; 34(7):2061–7. doi: 10.1016/s0735-1097(99)00495-7.
 139. Steffen BT, Lees SJ, Booth FW. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 105(6):1950–8. doi: 10.1152/jappphysiol.90884.2008.
 140. Remels AHV, Gosker HR, Bakker J, Guttridge DC, Schols AMWJ, Langen RCJ. Regulation of skeletal muscle oxidative phenotype by classical NF- κ B signalling. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(8):1313–25. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.018.
 141. Remels AHV, Gosker HR, Schrauwen P, Hommelberg PPH, Sliwinski P, Polkey M et al. TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia? *FASEB J* 2010; 24(12):5052–62. doi: 10.1096/fj.09-150714.
 142. Gosker HR, Lencer NHMK, Franssen FME, van der Vusse GJ, Wouters EFM, Schols AMWJ. Striking similarities in systemic factors contributing to decreased exercise capacity in patients with severe chronic heart failure or COPD. *Chest* 2003; 123(5):1416–24. doi: 10.1378/chest.123.5.1416.
 143. Pan M-R, Hung W-C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Spl-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(36):32775–80. doi: 10.1074/jbc.M202334200.
 144. Borner T, Arnold M, Ruud J, Breit SN, Langhans W, Lutz TA et al. Anorexia-cachexia syndrome in hepatoma tumour-bearing rats requires the area postrema but not vagal afferents and is paralleled by increased MIC-1/GDF15. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(3):417–27. doi: 10.1002/jcsm.12169.
 145. Sandek A, Swidsinski A, Schroedl W, Watson A, Valentova M, Herrmann R et al. Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure: a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 64(11):1092–102. doi: 10.1016/j.jacc.2014.06.1179.
 146. Hudgins LC, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Saal SD, Jiang X-C et al. A single intravenous dose of endotoxin rapidly alters serum lipoproteins and lipid transfer proteins in normal volunteers. *J Lipid Res* 2003; 44(8):1489–98. doi: 10.1194/jlr.M200440-JLR200.
 147. Rozentryt P, Haehling S von, Lainscak M, Nowak JU, Kalantar-Zadeh K, Polonski L et al. The effects of a high-

- caloric protein-rich oral nutritional supplement in patients with chronic heart failure and cachexia on quality of life, body composition, and inflammation markers: a randomized, double-blind pilot study. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2010; 1(1):35–42. doi: 10.1007/s13539-010-0008-0.
148. Rondanelli M, Klersy C, Terracol G, Talluri J, Maugeri R, Guido D et al. Whey protein, amino acids, and vitamin D supplementation with physical activity increases fat-free mass and strength, functionality, and quality of life and decreases inflammation in sarcopenic elderly. *Am J Clin Nutr* 2016; 103(3):830–40. doi: 10.3945/ajcn.115.113357.
149. Ishida J, Konishi M, Saitoh M, Anker M, Anker SD, Springer J. Myostatin signaling is up-regulated in female patients with advanced heart failure. *International Journal of Cardiology* 2017; 238:37–42. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.03.153.
150. Lenk K, Erbs S, Höllriegel R, Beck E, Linke A, Gielen S et al. Exercise training leads to a reduction of elevated myostatin levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol* 2012; 19(3):404–11. doi: 10.1177/1741826711402735.
151. George I, Bish LT, Kamalakkannan G, Petrilli CM, Oz MC, Naka Y et al. Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *European Journal of Heart Failure* 2010; 12(5):444–53. doi: 10.1093/eurjhf/hfq039.
152. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Sargent M, York A, Welle S et al. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation* 2010; 121(3):419–25. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.882068.
153. Biesemann N, Mendler L, Wietelmann A, Hermann S, Schäfers M, Krüger M et al. Myostatin regulates energy homeostasis in the heart and prevents heart failure. *Circ Res* 2014; 115(2):296–310. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304185.
154. Heximer SP, Watson N, Linder ME, Blumer KJ, Hepler JR. RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(26):14389–93. doi: 10.1073/pnas.94.26.14389.
155. Kobayashi M, Kasamatsu S, Shinozaki S, Yasuhara S, Kaneki M. Myostatin deficiency not only prevents muscle wasting but also improves survival in septic mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2021; 320(1):E150-E159. doi: 10.1152/ajpendo.00161.2020.
156. Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martyn JK, Bass JJ et al. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* 2002; 22(20):7066–82. doi: 10.1128/mcb.22.20.7066-7082.2002.
157. Wang B-W, Chang H, Kuan P, Shyu K-G. Angiotensin II activates myostatin expression in cultured rat neonatal cardiomyocytes via p38 MAP kinase and myocyte enhance factor 2 pathway. *J Endocrinol* 2008; 197(1):85–93. doi: 10.1677/JOE-07-0596.
158. Pötsch MS, Tschirner A, Palus S, Haehling S von, Doehner W, Beadle J et al. The anabolic catabolic transforming agent (ACTA) espidolol increases muscle mass and decreases fat mass in old rats. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2014; 5(2):149–58. doi: 10.1007/s13539-013-0125-7.
159. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993; 75(5):977–84. doi: 10.1016/0092-8674(93)90541-w.
160. Wettschureck N, Rütten H, Zywietz A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J et al. Absence of pressure overload induced

- myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat Med* 2001; 7(11):1236–40. doi: 10.1038/nm1101-1236.
161. Sanders PM, Russell ST, Tisdale MJ. Angiotensin II directly induces muscle protein catabolism through the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway and may play a role in cancer cachexia. *Br J Cancer* 2005; 93(4):425–34. doi: 10.1038/sj.bjc.6602725.
162. Song Y-H, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N, Delafontaine P. Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J Clin Invest* 2005; 115(2):451–8. doi: 10.1172/JCI22324.
163. Du Bois P, Pablo Tortola C, Lodka D, Kny M, Schmidt F, Song K et al. Angiotensin II Induces Skeletal Muscle Atrophy by Activating TFE β -Mediated MuRF1 Expression. *Circ Res* 2015; 117(5):424–36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.305393.
164. Rude MK, Duhaney T-AS, Kuster GM, Judge S, Heo J, Colucci WS et al. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 2005; 46(3):555–61. doi: 10.1161/01.HYP.0000176236.55322.18.
165. Zhang P, Yang Y, Chen X, Ruan Y, Zhou Y, Tian Y et al. Comparison of doxycycline, losartan, and their combination on the expression of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, and collagen remodeling in the noninfarcted myocardium after acute myocardial infarction in rats. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2005; 27(1):53–61.
166. Echeverría-Rodríguez O, Del Valle-Mondragón L, Hong E. Angiotensin 1-7 improves insulin sensitivity by increasing skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Peptides* 2014; 51:26–30. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.022.
167. Leite-Moreira AF, Castro-Chaves P, Pimentel-Nunes P, Lima-Carneiro A, Guerra MS, Soares JB et al. Angiotensin II acutely decreases myocardial stiffness: a novel AT1, PKC and Na⁺/H⁺ exchanger-mediated effect. *Br J Pharmacol* 2006; 147(6):690–7. doi: 10.1038/sj.bjp.0706659.
168. McEwan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon CJ. Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation* 1998; 98(24):2765–73. doi: 10.1161/01.cir.98.24.2765.
169. Pötsch MS, Ishida J, Palus S, Tschirner A, Haehling S von, Doehner W et al. MT-102 prevents tissue wasting and improves survival in a rat model of severe cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2020; 11(2):594–605. doi: 10.1002/jcsm.12537.
170. Minetti GC, Feige JN, Rosenstiel A, Bombard F, Meier V, Werner A et al. G α i2 signaling promotes skeletal muscle hypertrophy, myoblast differentiation, and muscle regeneration. *Sci Signal* 2011; 4(201):ra80. doi: 10.1126/scisignal.2002038.
171. Cunha TF, Bacurau AVN, Moreira JBN, Paixão NA, Campos JC, Ferreira JCB et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS One* 2012; 7(8):e41701. doi: 10.1371/journal.pone.0041701.
172. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307(4):205–11. doi: 10.1056/NEJM198207223070401.
173. Jensen BC, Swigart PM, Marco T de, Hoopes C, Simpson PC. {alpha}1-

- Adrenergic receptor subtypes in nonfailing and failing human myocardium. *Circ Heart Fail* 2009; 2(6):654–63. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.846212.
174. Nunn C, Zou M-X, Sobiesiak AJ, Roy AA, Kirshenbaum LA, Chidiac P. RGS2 inhibits beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Signal* 2010; 22(8):1231–9. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.03.015.
175. Krüger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; 27(5-7):435–44. doi: 10.1007/s10974-006-9090-5.
176. Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol* 2005; 125(3):257–71. doi: 10.1085/jgp.200409177.
177. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 2002; 90(11):1181–8. doi: 10.1161/01.res.0000021115.24712.99.
178. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T et al. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* 2000; 86(11):1114–21. doi: 10.1161/01.res.86.11.1114.
179. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4(9):648–57. doi: 10.1038/ncb839.
180. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(37):13489–94. doi: 10.1073/pnas.0405659101.
181. Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang W-G, Lucas J, Shor B et al. Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res* 2009; 69(15):6232–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0299.
182. Ganley IG, Du Lam H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 2009; 284(18):12297–305. doi: 10.1074/jbc.M900573200.
183. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001; 3(11):1014–9. doi: 10.1038/ncb1101-1014.
184. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121(2):179–93. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.031.
185. Lee D-F, Kuo H-P, Chen C-T, Hsu J-M, Chou C-K, Wei Y et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007; 130(3):440–55. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.058.
186. Inoki K, Zhu T, Guan K-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003; 115(5):577–90. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00929-2.
187. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30(2):214–26. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.003.

188. Chen JL, Walton KL, Winbanks CE, Murphy KT, Thomson RE, Makanji Y et al. Elevated expression of activins promotes muscle wasting and cachexia. *FASEB J* 2014; 28(4):1711–23. doi: 10.1096/fj.13-245894.
189. Joseph GA, Wang SX, Jacobs CE, Zhou W, Kimble GC, Tse HW et al. Partial Inhibition of mTORC1 in Aged Rats Counteracts the Decline in Muscle Mass and Reverses Molecular Signaling Associated with Sarcopenia. *Mol Cell Biol* 2019; 39(19). doi: 10.1128/MCB.00141-19.
190. Paturi S, Gutta AK, Katta A, Kakarla SK, Arvapalli RK, Gadde MK et al. Effects of aging and gender on muscle mass and regulation of Akt-mTOR-p70s6k related signaling in the F344BN rat model. *Mech Ageing Dev* 2010; 131(3):202–9. doi: 10.1016/j.mad.2010.01.008.
191. Zhang Q, Duplany A, Moncollin V, Mouradian S, Goillot E, Mazelin L et al. Lack of muscle mTOR kinase activity causes early onset myopathy and compromises whole-body homeostasis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2019; 10(1):35–53. doi: 10.1002/jcsm.12336.
192. Souza RWA, Piedade WP, Soares LC, Souza PAT, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One* 2014; 9(10):e110020. doi: 10.1371/journal.pone.0110020.
193. Zhu C, Yin Z, Tan B, Guo W. Insulin regulates titin pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863(9):2363–71. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.06.023.
194. Dunn SE, Burns JL, Michel RN. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21908–12. doi: 10.1074/jbc.274.31.21908.
195. Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 1998; 20(5):895–904. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80471-7.
196. Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J et al. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(9):5746–54. doi: 10.1074/jbc.274.9.5746.
197. Rich RC, Schulman H. Substrate-directed function of calmodulin in autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(43):28424–9. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819596132>.
198. Barrie AP, Clohessy AM, Buensuceso CS, Rogers MV, Allen JM. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(32):19666–71. doi: 10.1074/jbc.272.32.19666.
199. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 1995; 378(6557):641–4. doi: 10.1038/378641a0.
200. Park S, Uesugi M, Verdine GL. A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13):7130–5. doi: 10.1073/pnas.97.13.7130.
201. Nitsche J, Josts I, Heidemann J, Mertens HD, Maric S, Moulin M et al. Structural basis for activation of plasma-membrane Ca²⁺-ATPase by calmodulin. *Commun Biol* 2018;

- 1:206. doi: 10.1038/s42003-018-0203-7.
202. Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(45):27186–91. doi: 10.1074/jbc.270.45.27186.
203. Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(32):29060–6. doi: 10.1074/jbc.M503824200.
204. Pramod S, Shivakumar K. Mechanisms in cardiac fibroblast growth: an obligate role for Skp2 and FOXO3a in ERK1/2 MAPK-dependent regulation of p27kip1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 306(6):H844-55. doi: 10.1152/ajpheart.00933.2013.
205. Ermolova N, Kramerova I, Spencer MJ. Autolytic activation of calpain 3 proteinase is facilitated by calmodulin protein. *J Biol Chem* 2015; 290(2):996–1004. doi: 10.1074/jbc.M114.588780.
206. Chakkalakal JV, Harrison M-A, Carbonetto S, Chin E, Michel RN, Jasmin BJ. Stimulation of calcineurin signaling attenuates the dystrophic pathology in mdx mice. *Hum Mol Genet* 2004; 13(4):379–88. doi: 10.1093/hmg/ddh037.
207. Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 1998; 12(16):2499–509. doi: 10.1101/gad.12.16.2499.
208. Naya FJ, Mercer B, Shelton J, Richardson JA, Williams RS, Olson EN. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(7):4545–8. doi: 10.1074/jbc.275.7.4545.
209. Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL et al. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *EMBO J* 1994; 13(4):861–70.
210. Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV. Regulation of Ikb alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways. *J Immunol* 1995; 155(10):4685–91.
211. Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimnich A, Paya CV. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I kappa B kinase and NF-kappa B in T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(33):22923–31. doi: 10.1074/jbc.274.33.22923.
212. Sullivan MJ, Duscha BD, Klitgaard H, Kraus WE, Cobb FR, Saltin B. Altered expression of myosin heavy chain in human skeletal muscle in chronic heart failure. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29(7):860–6. doi: 10.1097/00005768-199707000-00004.
213. Vescovo G, Volterrani M, Zennaro R, Sandri M, Ceconi C, Lorusso R et al. Apoptosis in the skeletal muscle of patients with heart failure: investigation of clinical and biochemical changes. *Heart* 2000; 84(4):431–7. doi: 10.1136/heart.84.4.431.
214. Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85(5):1751–9. doi: 10.1161/01.cir.85.5.1751.
215. Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 2011; 333(6048):1440–5. doi: 10.1126/science.1202768.
216. Adams V, Jiang H, Yu J, Möbius-Winkler S, Fiehn E, Linke A et al.

- Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *Journal of the American College of Cardiology* 1999; 33(4):959–65. doi: 10.1016/s0735-1097(98)00626-3.
217. Mangner N, Weikert B, Bowen TS, Sandri M, Höllriegel R, Erbs S et al. Skeletal muscle alterations in chronic heart failure: differential effects on quadriceps and diaphragm. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2015; 6(4):381–90. doi: 10.1002/jcsm.12034.
218. Sandri M, Barberi L, Bijlsma AY, Blaauw B, Dyar KA, Milan G et al. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology* 2013; 14(3):303–23. doi: 10.1007/s10522-013-9432-9.
219. Wondolowski O, Redshaw Z, Mutungi G. Dihydrotestosterone treatment rescues the decline in protein synthesis as a result of sarcopenia in isolated mouse skeletal muscle fibres. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(1):48–56. doi: 10.1002/jcsm.12122.
220. Lodka D, Pahuja A, Geers-Knörr C, Scheibe RJ, Nowak M, Hamati J et al. Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2016; 7(2):165–80. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27493870/>.
221. Witt CC, Witt SH, Lerche S, Labeit D, Back W, Labeit S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J* 2008; 27(2):350–60. doi: 10.1038/sj.emboj.7601952.
222. Chen SN, Czernuszewicz G, Tan Y, Lombardi R, Jin J, Willerson JT et al. Human molecular genetic and functional studies identify TRIM63, encoding Muscle RING Finger Protein 1, as a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2012; 111(7):907–19. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.270207.
223. Fielitz J, Kim M-S, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ et al. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest* 2007; 117(9):2486–95. doi: 10.1172/JCI32827.
224. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 2007; 6(5):376–85. doi: 10.1016/j.cmet.2007.09.009.
225. Kedar V, McDonough H, Arya R, Li H-H, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(52):18135–40. doi: 10.1073/pnas.0404341102.
226. Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* 2005; 350(4):713–22. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.021.
227. Mrosek M, Labeit D, Witt S, Heerklotz H, Castelmur E von, Labeit S et al. Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin. *FASEB J* 2007; 21(7):1383–92. doi: 10.1096/fj.06-7644com.
228. McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol* 2002; 157(1):125–36. doi: 10.1083/jcb.200108089.
229. Vitale C, Spoletini I, Rosano GM. Frailty in Heart Failure: Implications

- for Management. *Cardiac Failure Review* 2018; 4(2):104–6. doi: 10.15420/cfr.2018.22.2.
230. Ding H, Zhang G, Sin KWT, Liu Z, Lin R-K, Li M et al. Activin A induces skeletal muscle catabolism via p38 β mitogen-activated protein kinase. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(2):202–12. doi: 10.1002/jcsm.12145.
231. Hulmi JJ, Nissinen TA, Räsänen M, Degerman J, Lautaoja JH, Hemanthakumar KA et al. Prevention of chemotherapy-induced cachexia by ACVR2B ligand blocking has different effects on heart and skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2018; 9(2):417–32. doi: 10.1002/jcsm.12265.
232. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(44):16260–5. doi: 10.1073/pnas.0607795103.
233. Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C. Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1994; 15(4):413–9. doi: 10.1007/BF00122115.
234. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011; 91(4):1447–531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010.
235. Larsson L, Edström L, Lindegren B, Gorza L, Schiaffino S. MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am J Physiol* 1991; 261(1 Pt 1):C93-101. doi: 10.1152/ajpcell.1991.261.1.C93.
236. Edström L, Kugelberg E. Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968; 31(5):424–33. doi: 10.1136/jnnp.31.5.424.
237. Close R. Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 1967; 193(1):45–55. doi: 10.1113/jphysiol.1967.sp008342.
238. Schiaffino S, Hanzlíková V, Pierobon S. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 1970; 47(1):107–19. doi: 10.1083/jcb.47.1.107.
239. Guth L, Samaha FJ. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 1969; 25(1):138–52. doi: 10.1016/0014-4886(69)90077-6.
240. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 1972; 11(14):2627–33. doi: 10.1021/bi00764a013.
241. Chemello F, Bean C, Cancellara P, Laveder P, Reggiani C, Lanfranchi G. Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers. *PLoS One* 2011; 6(2):e16807. doi: 10.1371/journal.pone.0016807.
242. Granzier HL, Akster HA, Keurs HET. Effect of thin filament length on the force-sarcomere length relation of skeletal muscle. *Am J Physiol* 1991; 260(5 Pt 1):C1060-70. doi: 10.1152/ajpcell.1991.260.5.C1060.
243. Horowitz R, Dalakas MC, Podolsky RJ. Single skinned muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy generate normal force. *Ann Neurol* 1990; 27(6):636–41. doi: 10.1002/ana.410270609.
244. Maves L, Waskiewicz AJ, Paul B, Cao Y, Tyler A, Moens CB et al. Pbx homeodomain proteins direct Myod activity to promote fast-muscle differentiation. *Development* 2007; 134(18):3371–82. doi: 10.1242/dev.003905.

245. Barash IA, Bang M-L, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL. Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(1):C218-27. doi: 10.1152/ajpcell.00055.2007.
246. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 1993; 118(4):1137-47.
247. Gill JF, Santos G, Schnyder S, Handschin C. PGC-1 α affects aging-related changes in muscle and motor function by modulating specific exercise-mediated changes in old mice. *Aging Cell* 2018; 17(1). doi: 10.1111/acel.12697.
248. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002; 418(6899):797-801. doi: 10.1038/nature00904.
249. Summermatter S, Thurnheer R, Santos G, Mosca B, Baum O, Treves S et al. Remodeling of calcium handling in skeletal muscle through PGC-1 α : impact on force, fatigability, and fiber type. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 302(1):C88-99. doi: 10.1152/ajpcell.00190.2011.
250. Simonini A, Chang K, Yue P, Long CS, Massie BM. Expression of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase is reduced in rats with postinfarction heart failure. *Heart* 1999; 81(3):303-7. doi: 10.1136/hrt.81.3.303.
251. Romanino K, Mazelin L, Albert V, Conjard-Duplany A, Lin S, Bentzinger CF et al. Myopathy caused by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inactivation is not reversed by restoring mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(51):20808-13. doi: 10.1073/pnas.1111448109.
252. St-Jean-Pelletier F, Pion CH, Leduc-Gaudet J-P, Sgarioto N, Zovilé I, Barbat-Artigas S et al. The impact of ageing, physical activity, and pre-frailty on skeletal muscle phenotype, mitochondrial content, and intramyocellular lipids in men. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017; 8(2):213-28. doi: 10.1002/jcsm.12139.
253. Jacobs RA, Díaz V, Soldini L, Haider T, Thomassen M, Nordsborg NB et al. Fast-twitch glycolytic skeletal muscle is predisposed to age-induced impairments in mitochondrial function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68(9):1010-22. doi: 10.1093/gerona/gls335.
254. Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, Solarino G, Santacroce G, Papa S. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226(1):73-82. doi: 10.1016/0925-4439(94)90061-2.
255. Porter C, Hurren NM, Cotter MV, Bhattarai N, Reidy PT, Dillon EL et al. Mitochondrial respiratory capacity and coupling control decline with age in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2015; 309(3):E224-32. doi: 10.1152/ajpendo.00125.2015.
256. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* (1985) 1992; 73(5):1797-804. doi: 10.1152/jappl.1992.73.5.1797.
257. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J et al. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation* 2001; 104(2):134-6. doi: 10.1161/01.cir.104.2.134.
258. Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling

- and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 2000; 87(5):392–8. doi: 10.1161/01.res.87.5.392.
259. Sun J, Morgan M, Shen R-F, Steenbergen C, Murphy E. Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ Res* 2007; 101(11):1155–63. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.155879.
260. He L, Lemasters JJ. Heat shock suppresses the permeability transition in rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(19):16755–60. doi: 10.1074/jbc.M300153200.
261. Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C et al. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6(1):49–58. doi: 10.1379/1466-1268(2001)006<0049:hpmotc>2.0.co;2
262. Katschinski DM, Boos K, Schindler SG, Fandrey J. Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(28):21094–8. doi: 10.1074/jbc.M001629200.
263. Kötter S, Unger A, Hamdani N, Lang P, Vorgerd M, Nagel-Steger L et al. Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. *J Cell Biol* 2014; 204(2):187–202. doi: 10.1083/jcb.201306077.
264. Tucker NR, Shelden EA. Hsp27 associates with the titin filament system in heat-shocked zebrafish cardiomyocytes. *Exp Cell Res* 2009; 315(18):3176–86. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.06.030.
265. Donlin LT, Andresen C, Just S, Rudensky E, Pappas CT, Kruger M et al. Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. *Genes Dev* 2012; 26(2):114–9. doi: 10.1101/gad.177758.111.
266. Behn-Krappa A, Newton AC. The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr Biol* 1999; 9(14):728–37. doi: 10.1016/s0960-9822(99)80332-7.
267. Edwards AS, Newton AC. Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(29):18382–90. doi: 10.1074/jbc.272.29.18382.
268. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 1995; 5(12):1394–403. doi: 10.1016/s0960-9822(95)00277-6.
269. Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(6):3544–9. doi: 10.1074/jbc.272.6.3544.
270. Dutil EM, Keranen LM, DePaoli-Roach AA, Newton AC. In vivo regulation of protein kinase C by transphosphorylation followed by autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(47):29359–62.
271. Orr JW, Newton AC. Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(44):27715–8.
272. Magnino PE, La Houssaye BA de, Masaracchia RA. Resolution and characterization of calcium/phospholipid-dependent protein kinase and H4 protease-activated protein kinase activities in lymphoid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116(2):675–81. doi: 10.1016/0006-291x(83)90578-8.

273. Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 1998; 18(2):790–8. doi: 10.1128/mcb.18.2.790.
274. Burkart EM, Sumandea MP, Kobayashi T, Nili M, Martin AF, Homsher E et al. Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein kinase C sites on cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity. *J Biol Chem* 2003; 278(13):11265–72. doi: 10.1074/jbc.M210712200.
275. Jideama NM, Noland TA, Raynor RL, Blobe GC, Fabbro D, Kazanietz MG et al. Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *J Biol Chem* 1996; 271(38):23277–83. doi: 10.1074/jbc.271.38.23277.
276. Pi Y, Zhang D, Kemnitz KR, Wang H, Walker JW. Protein kinase C and A sites on troponin I regulate myofilament Ca²⁺ sensitivity and ATPase activity in the mouse myocardium. *J Physiol* 2003; 552(Pt 3):845–57. doi: 10.1113/jphysiol.2003.045260.
277. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R et al. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 2004; 10(3):248–54. doi: 10.1038/nm1000.
278. Rohde S, Sabri A, Kamasamudran R, Steinberg SF. The $\alpha(1)$ -adrenoceptor subtype- and protein kinase C isoform-dependence of Norepinephrine's actions in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32(7):1193–209. doi: 10.1006/jmcc.2000.1153.
279. Takeishi Y, Bhagwat A, Ball NA, Kirkpatrick DL, Periasamy M, Walsh RA. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on protein kinase C and SR proteins in heart failure. *Am J Physiol* 1999; 276(1):H53–62. doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.1.H53.
280. Thomson DM. The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10). doi: 10.3390/ijms19103125.
281. Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* 1989; 186(1-2):129–36. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15186.x.
282. Ferrer A, Caelles C, Massot N, Hegardt FG. Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 132(2):497–504. doi: 10.1016/0006-291x(85)91161-1.
283. Jørgensen SB, Wojtaszewski JFP, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y et al. Effects of α -AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J* 2005; 19(9):1146–8. doi: 10.1096/fj.04-3144fje.
284. Vavvas D, Apazidis A, Saha AK, Gamble J, Patel A, Kemp BE et al. Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(20):13255–61. doi: 10.1074/jbc.272.20.13255.
285. Nielsen JN, Mustard KJW, Graham DA, Yu H, MacDonald CS, Pilegaard H et al. 5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2003; 94(2):631–41. doi: 10.1152/jappphysiol.00642.2002.
286. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and

- identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(44):27879–87. doi: 10.1074/jbc.271.44.27879.
287. Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol* 1994; 4(4):315–24. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00070-1.
288. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(27):23977–80. doi: 10.1074/jbc.C200171200.
289. Cheng SWY, Fryer LGD, Carling D, Shepherd PR. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(16):15719–22. doi: 10.1074/jbc.C300534200.
290. Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L et al. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* 2002; 12(16):1419–23. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01077-1.
291. Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D et al. Important role for AMPK α 1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB J* 2009; 23(7):2264–73. doi: 10.1096/fj.08-119057.
292. Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP et al. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(41):30107–19. doi: 10.1074/jbc.M705325200.
293. Nystrom GJ, Lang CH. Sepsis and AMPK Activation by AICAR Differentially Regulate FoxO-1, -3 and -4 mRNA in Striated Muscle. *Int J Clin Exp Med* 2008; 1(1):50–63.
294. Sanchez AMJ, Csibi A, Raibon A, Cornille K, Gay S, Bernardi H et al. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem* 2012; 113(2):695–710. doi: 10.1002/jcb.23399.
295. Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JHPM, Dubbelhuis PF, Helmond MTJ, Codogno P et al. AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(46):34870–9. doi: 10.1074/jbc.M605488200.
296. Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang H-G. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One* 2010; 5(11):e15394. doi: 10.1371/journal.pone.0015394.
297. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13(2):132–41. doi: 10.1038/ncb2152.
298. Weerasekara VK, Panek DJ, Broadbent DG, Mortenson JB, Mathis AD, Logan GN et al. Metabolic-stress-induced rearrangement of the 14-3-3 ζ interactome promotes autophagy via a ULK1- and AMPK-regulated 14-3-3 ζ interaction with phosphorylated Atg9. *Mol Cell Biol* 2014; 34(24):4379–88. doi: 10.1128/MCB.00740-14.
299. Zhang D, Wang W, Sun X, Xu D, Wang C, Zhang Q et al. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy* 2016; 12(9):1447–59. doi: 10.1080/15548627.2016.1185576.
300. Pauly M, Daussin F, Burelle Y, Li T, Godin R, Fauconnier J et al. AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am J Pathol*

- 2012; 181(2):583–92. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.04.004.
301. Egawa T, Goto A, Ohno Y, Yokoyama S, Ikuta A, Suzuki M et al. Involvement of AMPK in regulating slow-twitch muscle atrophy during hindlimb unloading in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2015; 309(7):E651–62. doi: 10.1152/ajpendo.00165.2015.
302. O'Neill HM, Maarbjerg SJ, Crane JD, Jeppesen J, Jørgensen SB, Schertzer JD et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(38):16092–7. doi: 10.1073/pnas.1105062108.
303. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buléon M et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8(5):437–45. doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.003.
304. Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakí C, Coste A, Lagouge M et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* 2010; 11(3):213–9. doi: 10.1016/j.cmet.2010.02.006.
305. Kovacic S, Soltys C-LM, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JRB. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(41):39422–7. doi: 10.1074/jbc.M305371200.
306. Esteve-Puig R, Canals F, Colomé N, Merlino G, Recio JA. Uncoupling of the LKB1-AMPKalpha energy sensor pathway by growth factors and oncogenic BRAF. *PLoS One* 2009; 4(3):e4771. doi: 10.1371/journal.pone.0004771.
307. Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 2004; 23(4):833–43. doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.
308. Lantier L, Mounier R, Leclerc J, Pende M, Foretz M, Viollet B. Coordinated maintenance of muscle cell size control by AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 2010; 24(9):3555–61. doi: 10.1096/fj.10-155994.
309. Guo Y, Meng J, Tang Y, Wang T, Wei B, Feng R et al. AMP-activated kinase $\alpha 2$ deficiency protects mice from denervation-induced skeletal muscle atrophy. *Arch Biochem Biophys* 2016; 600:56–60. doi: 10.1016/j.abb.2016.04.015.
310. Han B, Zhu MJ, Ma C, Du M. Rat hindlimb unloading down-regulates insulin like growth factor-1 signaling and AMP-activated protein kinase, and leads to severe atrophy of the soleus muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32(6):1115–23. doi: 10.1139/H07-102.
311. Fu X, Zhu M, Zhang S, Foretz M, Viollet B, Du M. Obesity Impairs Skeletal Muscle Regeneration Through Inhibition of AMPK. *Diabetes* 2016; 65(1):188–200. doi: 10.2337/db15-0647.
312. Deng Z, Luo P, Lai W, Song T, Peng J, Wei H-K. Myostatin inhibits eEF2K-eEF2 by regulating AMPK to suppress protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 494(1-2):278–84. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.040.
313. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10(2). doi: 10.1101/cshperspect.a023200.
314. HUXLEY AF, NIEDERGERKE R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 1954; 173(4412):971–3. doi: 10.1038/173971a0.
315. HUXLEY H, HANSON J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 1954;

- 173(4412):973–6. doi:
10.1038/173973a0.
316. Schroeter JP, Bretauiere JP, Sass RL, Goldstein MA. Three-dimensional structure of the Z band in a normal mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol* 1996; 133(3):571–83. doi:
10.1083/jcb.133.3.571.
317. Horowitz R, Podolsky RJ. The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments. *J Cell Biol* 1987; 105(5):2217–23. doi:
10.1083/jcb.105.5.2217.
318. Slayter HS, Lowey S. Substructure of the myosin molecule as visualized by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967; 58(4):1611–8. doi:
10.1073/pnas.58.4.1611.
319. HUXLEY HE. ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON THE STRUCTURE OF NATURAL AND SYNTHETIC PROTEIN FILAMENTS FROM STRIATED MUSCLE. *J Mol Biol* 1963; 7:281–308. doi:
10.1016/s0022-2836(63)80008-x.
320. Sjöström M, Squire JM. Fine structure of the A-band in cryo-sections. *J Mol Biol* 1977; 109(1):49–68. doi:
10.1016/S0022-2836(77)80045-4.
321. Sweeney HL, Holzbaaur ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10(5). doi:
10.1101/cshperspect.a021931.
322. Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 1993; 261(5117):58–65. doi:
10.1126/science.8316858.
323. Xu C, Craig R, Tobacman L, Horowitz R, Lehman W. Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophysical Journal* 1999; 77(2):985–92. doi:
10.1016/S0006-3495(99)76949-3.
324. Yildiz A, Park H, Safer D, Yang Z, Chen L-Q, Selvin PR et al. Myosin VI steps via a hand-over-hand mechanism with its lever arm undergoing fluctuations when attached to actin. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(36):37223–6. doi:
10.1074/jbc.C400252200.
325. La Cruz EM de, Wells AL, Rosenfeld SS, Ostap EM, Sweeney HL. The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(24):13726–31. doi:
10.1073/pnas.96.24.13726.
326. Maruyama K, Yoshioka T, Higuchi H, Ohashi K, Kimura S, Natori R. Connectin filaments link thick filaments and Z lines in frog skeletal muscle as revealed by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1985; 101(6):2167–72. doi:
10.1083/jcb.101.6.2167.
327. Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol* 1988; 106(5):1563–72. doi:
10.1083/jcb.106.5.1563.
328. Trombitás K, Granzier H. Actin removal from cardiac myocytes shows that near Z line titin attaches to actin while under tension. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 1):C662-70. doi:
10.1152/ajpcell.1997.273.2.C662.
329. Jin JP. Cloned rat cardiac titin class I and class II motifs. Expression, purification, characterization, and interaction with F-actin. *J Biol Chem* 1995; 270(12):6908–16.
330. Houmeida A, Baron A, Keen J, Khan GN, Knight PJ, Stafford WF et al. Evidence for the oligomeric state of 'elastic' titin in muscle sarcomeres. *J Mol Biol* 2008; 384(2):299–312. doi:
10.1016/j.jmb.2008.09.030.
331. Wang K, Wright J. Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments

- anchored at the Z line. *J Cell Biol* 1988; 107(6 Pt 1):2199–212. doi: 10.1083/jcb.107.6.2199.
332. Witt CC, Burkart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H et al. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J* 2006; 25(16):3843–55. doi: 10.1038/sj.emboj.7601242.
333. Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* 1986; 323(6084):160–4. doi: 10.1038/323160a0.
334. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y et al. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 2000; 86(1):59–67. doi: 10.1161/01.res.86.1.59.
335. Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Rüegg JC, Labeit S. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol* 1996; 261(1):62–71. doi: 10.1006/jmbi.1996.0441.
336. Tskhovrebova L, Walker ML, Grossmann JG, Khan GN, Baron A, Trinick J. Shape and flexibility in the titin 11-domain super-repeat. *J Mol Biol* 2010; 397(4):1092–105. doi: 10.1016/j.jmb.2010.01.073.
337. Minajeva A, Kulke M, Fernandez JM, Linke WA. Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils. *Biophysical Journal* 2001; 80(3):1442–51. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76116-4.
338. Granzier H, Helmes M, Trombitás K. Nonuniform elasticity of titin in cardiac myocytes: a study using immunoelectron microscopy and cellular mechanics. *Biophysical Journal* 1996; 70(1):430–42. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79586-3.
339. Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R. Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: a test of the segmental extension model of resting tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(16):7101–5. doi: 10.1073/pnas.88.16.7101.
340. Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R. Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophysical Journal* 1993; 64(4):1161–77. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81482-6.
341. Granzier HL, Wang K. Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles: the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. *Biophysical Journal* 1993; 65(5):2141–59. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81262-1.
342. Li H, Linke WA, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Kerkvliet JG, Lu H et al. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* 2002; 418(6901):998–1002. doi: 10.1038/nature00938.
343. Trombitás K, Greaser M, Labeit S, Jin JP, Kellermayer M, Helmes M et al. Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol* 1998; 140(4):853–9. doi: 10.1083/jcb.140.4.853.
344. Itoh Y, Suzuki T, Kimura S, Ohashi K, Higuchi H, Sawada H et al. Extensible and less-extensible domains of connectin filaments in stretched vertebrate skeletal muscle sarcomeres as detected by immunofluorescence and immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. *J Biochem* 1988; 104(4):504–8. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122499.
345. Trombitás K, Pollack GH. Elastic properties of connecting filaments along the sarcomere. *Adv Exp Med Biol* 1993; 332:71–9. doi: 10.1007/978-1-4615-2872-2_7.
346. Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*

- 1995; 270(5234):293–6. doi: 10.1126/science.270.5234.293.
347. Linke WA, Popov VI, Pollack GH. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophysical Journal* 1994; 67(2):782–92. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80538-7.
348. Horowitz R, Maruyama K, Podolsky RJ. Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J Cell Biol* 1989; 109(5):2169–76. doi: 10.1083/jcb.109.5.2169.
349. Labeit D, Watanabe K, Witt C, Fujita H, Wu Y, Lahmers S et al. Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23):13716–21. doi: 10.1073/pnas.2235652100.
350. Horowitz R, Podolsky RJ. Thick filament movement and isometric tension in activated skeletal muscle. *Biophysical Journal* 1988; 54(1):165–71. doi: 10.1016/S0006-3495(88)82941-2.
351. Farman GP, Allen EJ, Schoenfelt KQ, Backx PH, Tombe PP de. The role of thin filament cooperativity in cardiac length-dependent calcium activation. *Biophysical Journal* 2010; 99(9):2978–86. doi: 10.1016/j.bpj.2010.09.003.
352. Mateja RD, Greaser ML, Tombe PP de. Impact of titin isoform on length dependent activation and cross-bridge cycling kinetics in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(4):804–11. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.011.
353. Gautel M, Leonard K, Labeit S. Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *EMBO J* 1993; 12(10):3827–34.
354. Sebestyén MG, Wolff JA, Greaser ML. Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 9):3029–37.
355. Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM et al. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 2009; 104(1):87–94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184408.
356. Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS et al. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 2013; 112(4):664–74. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300105.
357. Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli C, Methawasin M, Hutchinson KR, Tsapralis G et al. The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 54:90–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.012.
358. Lanzicher T, Zhou T, Saripalli C, Keschrums V, Smith Iii JE, Mayans O et al. Single-Molecule Force Spectroscopy on the N2A Element of Titin: Effects of Phosphorylation and CARP. *Front Physiol* 2020; 11:173. doi: 10.3389/fphys.2020.00173.
359. Colomer JM, Mao L, Rockman HA, Means AR. Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol* 2003; 17(2):183–92. doi: 10.1210/me.2002-0350.
360. Ali MAM, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010; 122(20):2039–47. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930222.
361. Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B et al. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles

- in patients with heart failure. *J Card Fail* 2002; 8(6):390–8. doi: 10.1054/jcaf.2002.129659.
362. Sun S, Henriksen K, Karsdal MA, Armbrecht G, Belavý DL, Felsenberg D et al. Measurement of a MMP-2 degraded Titin fragment in serum reflects changes in muscle turnover induced by atrophy. *Exp Gerontol* 2014; 58:83–9. doi: 10.1016/j.exger.2014.07.016.
363. Coulis G, Becila S, Herrera-Mendez CH, Sentandreu MA, Raynaud F, Richard I et al. Calpain 1 binding capacities of the N1-line region of titin are significantly enhanced by physiological concentrations of calcium. *Biochemistry* 2008; 47(35):9174–83. doi: 10.1021/bi800315v.
364. Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, Mineki R et al. Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2008; 283(21):14801–14. doi: 10.1074/jbc.M708262200.
365. Bullard B, Ferguson C, Minajeva A, Leake MC, Gautel M, Labeit D et al. Association of the chaperone alphaB-crystallin with titin in heart muscle. *J Biol Chem* 2004; 279(9):7917–24. doi: 10.1074/jbc.M307473200.
366. Golenhofen N, Arbeiter A, Koob R, Drenckhahn D. Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(3):309–19. doi: 10.1006/jmcc.2001.1513.
367. Moulik M, Vatta M, Witt SH, Arola AM, Murphy RT, McKenna WJ et al. ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 54(4):325–33. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.076.
368. Witt CC, Ono Y, Puschmann E, McNabb M, Wu Y, Gotthardt M et al. Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling. *J Mol Biol* 2004; 336(1):145–54. doi: 10.1016/j.jmb.2003.12.021.
369. Lun AS, Chen J, Lange S. Probing muscle ankyrin-repeat protein (MARPP) structure and function. *Anat Rec (Hoboken)* 2014; 297(9):1615–29. doi: 10.1002/ar.22968.
370. Tsukamoto Y, Senda T, Nakano T, Nakada C, Hida T, Ishiguro N et al. Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type I skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation. *Lab Invest* 2002; 82(5):645–55. doi: 10.1038/labinvest.3780459.
371. Laure L, Suel L, Roudaut C, Bourg N, Ouali A, Bartoli M et al. Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodelling. *FEBS J* 2009; 276(3):669–84. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06814.x.
372. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NMP, Lahmers S et al. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110(2):155–62. doi: 10.1161/01.CIR.0000135591.37759.A F.
373. Ikeda K, Emoto N, Matsuo M, Yokoyama M. Molecular identification and characterization of a novel nuclear protein whose expression is up-regulated in insulin-resistant animals. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(6):3514–20. doi: 10.1074/jbc.M204563200.
374. Schmeichel KL, Beckerle MC. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 1994; 79(2):211–9. doi: 10.1016/0092-8674(94)90191-0.
375. Arber S, Hunter JJ, Ross J, Hongo M, Sansig G, Borg J et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac

- cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997; 88(3):393–403. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81878-4.
376. Zhou Q, Chu PH, Huang C, Cheng CF, Martone ME, Knoll G et al. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *J Cell Biol* 2001; 155(4):605–12. doi: 10.1083/jcb.200107092.
377. Kong Y, Flick MJ, Kudla AJ, Konieczny SF. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol* 1997; 17(8):4750–60. doi: 10.1128/mcb.17.8.4750.
378. Ostap EM. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *J Muscle Res Cell Motil* 2002; 23(4):305–8. doi: 10.1023/a:1022047102064.
379. Mues A, van der Ven PF, Young P, Fürst DO, Gautel M. Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett* 1998; 428(1-2):111–4. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00501-8.
380. Zou P, Pinotsis N, Lange S, Song Y-H, Popov A, Mavridis I et al. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* 2006; 439(7073):229–33. doi: 10.1038/nature04343.
381. Tian L-F, Li H-Y, Jin B-F, Pan X, Man J-H, Zhang P-J et al. MDM2 interacts with and downregulates a sarcomeric protein, TCAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(1):355–61. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.04.108.
382. Jeong D, Kim JM, Cha H, Oh JG, Park J, Yun S-H et al. PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circ Res* 2008; 102(6):711–9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165985.
383. Witte S, Villalba M, Bi K, Liu Y, Isakov N, Altman A. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(3):1902–9. doi: 10.1074/jbc.275.3.1902.
384. Linke WA, Krüger M. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda)* 2010; 25(3):186–98. doi: 10.1152/physiol.00005.2010.
385. Arber S, Halder G, Caroni P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 1994; 79(2):221–31. doi: 10.1016/0092-8674(94)90192-9.
386. Lange S, Auerbach D, McLoughlin P, Perriard E, Schäfer BW, Perriard J-C et al. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 24):4925–36. doi: 10.1242/jcs.00181.
387. Sheikh F, Raskin A, Chu P-H, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M et al. An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(12):3870–80. doi: 10.1172/JCI34472.
388. Schneider AG, Sultan KR, Pette D. Muscle LIM protein: expressed in slow muscle and induced in fast muscle by enhanced contractile activity. *Am J Physiol* 1999; 276(4):C900–6. doi: 10.1152/ajpcell.1999.276.4.C900.
389. Campbell WG, Gordon SE, Carlson CJ, Pattison JS, Hamilton MT, Booth FW. Differential global gene expression in red and white skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(4):C763–8. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C763.
390. Zolk O, Caroni P, Böhm M. Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation* 2000; 101(23):2674–7. doi: 10.1161/01.cir.101.23.2674.

391. Wilding JR, Lygate CA, Davies KE, Neubauer S, Clarke K. MLP accumulation and remodelling in the infarcted rat heart. *European Journal of Heart Failure* 2006; 8(4):343–6. doi: 10.1016/j.ejheart.2005.10.006.
392. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO et al. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 1998; 395(6705):863–9. doi: 10.1038/27603.
393. Heierhorst J, Kobe B, Feil SC, Parker MW, Benian GM, Weiss KR et al. Ca²⁺/S100 regulation of giant protein kinases. *Nature* 1996; 380(6575):636–9. doi: 10.1038/380636a0.
394. Puchner EM, Alexandrovich A, Kho AL, Hensen U, Schäfer LV, Brandmeier B et al. Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(36):13385–90. doi: 10.1073/pnas.0805034105.
395. Fuller SJ, Gillespie-Brown J, Sugden PH. Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(29):18146–52. doi: 10.1074/jbc.273.29.18146.
396. Bell SP, Nyland L, Tischler MD, McNabb M, Granzier H, LeWinter MM. Alterations in the determinants of diastolic suction during pacing tachycardia. *Circ Res* 2000; 87(3):235–40. doi: 10.1161/01.res.87.3.235.
397. Morano I, Hädicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RH, Böhm M et al. Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26(3):361–8. doi: 10.1006/jmcc.1994.1045.
398. Neagoe C, Kulke M, Del Monte F, Gwathmey JK, Tombe PP de, Hajjar RJ et al. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 2002; 106(11):1333–41. doi: 10.1161/01.cir.0000029803.93022.93.
399. Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM et al. Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation* 2002; 106(11):1384–9. doi: 10.1161/01.cir.0000029804.61510.02.
400. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK et al. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 2004; 95(7):708–16. doi: 10.1161/01.RES.0000143901.37063.2f
401. Schwinger RH, Böhm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner HJ et al. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res* 1994; 74(5):959–69. doi: 10.1161/01.res.74.5.959.
402. Borbély A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C et al. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res* 2009; 104(6):780–6. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193326.
403. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 1999; 99(4):546–51. doi: 10.1161/01.cir.99.4.546.
404. Vila-Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E et al. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007; 73(4):689–98. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.12.003.
405. Grützner A, Garcia-Manyes S, Kötter S, Badilla CL, Fernandez JM, Linke WA. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the

- cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophysical Journal* 2009; 97(3):825–34. doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.037.
406. Stephenson GM, O'Callaghan A, Stephenson DG. Single-fiber study of contractile and biochemical properties of skeletal muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1994; 43(5):622–8. doi: 10.2337/diab.43.5.622.
407. Lesniewski LA, Miller TA, Armstrong RB. Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2003; 28(4):493–500. doi: 10.1002/mus.10468.
408. Voitenko NV, Kruglikov IA, Kostyuk EP, Kostyuk PG. Effect of streptozotocin-induced diabetes on the activity of calcium channels in rat dorsal horn neurons. *Neuroscience* 2000; 95(2):519–24. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00453-4.
409. Das PK, Bray GM, Aguayo AJ, Rasminsky M. Diminished ouabain-sensitive, sodium-potassium ATPase activity in sciatic nerves of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Neurol* 1976; 53(1):285–8. doi: 10.1016/0014-4886(76)90299-5.
410. Kimura I, Okazaki M, Kimura M. Streptozotocin-diabetes modifies acetylcholine release from mouse phrenic nerve terminal and presynaptic sensitivity to succinylcholine. *Jpn J Pharmacol* 1993; 62(1):35–41. doi: 10.1254/jjp.62.35.
411. Nojima H, Tsuneki H, Kimura I, Kimura M. Accelerated desensitization of nicotinic receptor channels and its dependence on extracellular calcium in isolated skeletal muscles of streptozotocin-diabetic mice. *Br J Pharmacol* 1995; 116(1):1680–4. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb16391.x.
412. Fahim MA, el-Sabban F, Davidson N. Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice. *Anat Rec* 1998; 251(2):240–4. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199806)251:2<240::AID-AR13>3.0.CO;2-O.
413. Nakagawa M, Kobayashi S, Kimura I, Kimura M. Diabetic state-induced modification of Ca, Mg, Fe and Zn content of skeletal, cardiac and smooth muscles. *Endocrinol Jpn* 1989; 36(6):795–807. doi: 10.1507/endocrj1954.36.795.
414. Delbono O. Ca²⁺ modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat skeletal muscle fibers. *J Membr Biol* 1995; 146(1):91–9.
415. Benders AA, Oosterhof A, Wevers RA, Veerkamp JH. Excitation-contraction coupling of cultured human skeletal muscle cells and the relation between basal cytosolic Ca²⁺ and excitability. *Cell Calcium* 1997; 21(1):81–91. doi: 10.1016/s0143-4160(97)90099-3.
416. Ganguly PK, Mathur S, Gupta MP, Beamish RE, Dhalla NS. Calcium pump activity of sarcoplasmic reticulum in diabetic rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1986; 251(5 Pt 1):E515–23. doi: 10.1152/ajpendo.1986.251.5.E515.
417. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004; 18(1):39–51. doi: 10.1096/fj.03-0610com.
418. Paturi S, Gutta AK, Kakarla SK, Katta A, Arnold EC, Wu M et al. Impaired overload-induced hypertrophy in obese Zucker rat slow-twitch skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2010; 108(1):7–13. doi: 10.1152/jappphysiol.00330.2009.
419. Lehti TM, Silvennoinen M, Kivelä R, Kainulainen H, Komulainen J. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of titin-based stretch-sensing complexes in mouse striated muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292(2):E533–42. doi: 10.1152/ajpendo.00229.2006.
420. Katta A, Kakarla SK, Manne NDPK, Wu M, Kundla S, Kolli MB et al.

- Diminished muscle growth in the obese Zucker rat following overload is associated with hyperphosphorylation of AMPK and dsRNA-dependent protein kinase. *J Appl Physiol* (1985) 2012; 113(3):377–84. doi: 10.1152/jappphysiol.00397.2011.
421. Rasmussen BB, Fujita S, Wolfe RR, Mittendorfer B, Roy M, Rowe VL et al. Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *FASEB J* 2006; 20(6):768–9. doi: 10.1096/fj.05-4607fje.
422. Medina-Sanchez M, Rodriguez-Sanchez C, Vega-Alvarez JA, Menedez-Pelaez A, Perez-Casas A. Proximal skeletal muscle alterations in streptozotocin-diabetic rats: a histochemical and morphometric analysis. *Am J Anat* 1991; 191(1):48–56. doi: 10.1002/aja.1001910105.
423. Paulus SF, Grossie J. Skeletal muscle in alloxan diabetes. A comparison of isometric contractions in fast and slow muscle. *Diabetes* 1983; 32(11):1035–9. doi: 10.2337/diab.32.11.1035.
424. Hopf A-E, Andresen C, Kötter S, Isić M, Ulrich K, Sahin S et al. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res* 2018; 123(3):342–55. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312166.
425. Scherbakov N, Bauer M, Sandek A, Szabó T, Töpfer A, Jankowska EA et al. Insulin resistance in heart failure: differences between patients with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. *European Journal of Heart Failure* 2015; 17(10):1015–21. doi: 10.1002/ejhf.317.
426. Morgan SA, Sherlock M, Gathercole LL, Lavery GG, Lenaghan C, Bujalska IJ et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* 2009; 58(11):2506–15. doi: 10.2337/db09-0525.
427. Castan-Laurell I, Vítková M, Daviaud D, Dray C, Kováčiková M, Kovacova Z et al. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(6):905–10. doi: 10.1530/EJE-08-0039.
428. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2014; 10(2):131–45. doi: 10.2174/1573399810666140508121012.
429. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* 1979; 59(3):719–809. doi: 10.1152/physrev.1979.59.3.719.
430. Fryer MW, Gage PW, Neering IR, Dulhunty AF, Lamb GD. Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase. *Pflugers Arch* 1988; 411(1):76–9. doi: 10.1007/BF00581649.
431. Bagni MA, Cecchi G, Colombini B, Colomo F. A Non-Cross-Bridge Stiffness in Activated Frog Muscle Fibers. *Biophysical Journal* 2002; 82(6):3118–27. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75653-1.
432. Mutungi G, Ranatunga KW. The viscous, viscoelastic and elastic characteristics of resting fast and slow mammalian (rat) muscle fibres. *J Physiol* 1996; 496 (Pt 3):827–36. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021730.
433. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
434. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680–5. Verfügbar unter:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/>.
435. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
436. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9):4350–4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
437. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112(2):195–203. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
438. Dunn SD. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 1986; 157(1):144–53. doi: 10.1016/0003-2697(86)90207-1.
439. Tatsumi R, Hattori A. Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose. *Anal Biochem* 1995; 224(1):28–31. doi: 10.1006/abio.1995.1004.
440. Ruijter JM, Thygesen HH, Schoneveld OJLM, Das AT, Berkhout B, Lamers WH. Factor correction as a tool to eliminate between-session variation in replicate experiments: application to molecular biology and retrovirology. *Retrovirology* 2006; 3:2. doi: 10.1186/1742-4690-3-2.
441. Cops J, Haesen S, Moor B de, Mullens W, Hansen D. Current animal models for the study of congestion in heart failure: an overview. *Heart Fail Rev* 2019; 24(3):387–97. doi: 10.1007/s10741-018-9762-4.
442. Lowe JE, Reimer KA, Jennings RB. Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk. *Am J Pathol* 1978; 90(2):363–79.
443. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44(4):503–12. doi: 10.1161/01.res.44.4.503.
444. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281(5):R1734–45. doi: 10.1152/ajpregu.2001.281.5.R1734.
445. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379(6566):632–5. doi: 10.1038/379632a0.
446. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84(3):491–5. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81294-5.
447. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83(7):1263–71. doi: 10.1016/0092-8674(95)90151-5.
448. Hummel KP, Coleman DL, Lane PW. The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL-KsJ and C57BL-6J strains. *Biochem Genet* 1972; 7(1):1–13. doi: 10.1007/BF00487005.
449. Berglund O, Frankel BJ, Hellman B. Development of the insulin secretory defect in genetically diabetic (db/db) mouse. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1978; 87(3):543–51. doi: 10.1530/acta.0.0870543.

450. Coleman DL, Hummel KP. Hyperinsulinemia in pre-weaning diabetes (db) mice. *Diabetologia* 1974; 10 Suppl:607–10. doi: 10.1007/BF01221993.
451. Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J Lipid Res* 1972; 13(1):2–11.
452. Saiki A, Ohira M, Endo K, Koide N, Oyama T, Murano T et al. Circulating angiotensin II is associated with body fat accumulation and insulin resistance in obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2009; 58(5):708–13. doi: 10.1016/j.metabol.2009.01.013.
453. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer MN et al. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010; 95(3):1404–11. doi: 10.1210/jc.2009-1619.
454. Hirose Y, Hata K, Kuno T, Yoshida K, Sakata K, Yamada Y et al. Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice. *Carcinogenesis* 2004; 25(5):821–5. doi: 10.1093/carcin/bgh059.
455. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J-P et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295(14):1681–7. doi: 10.1001/jama.295.14.1681.
456. Chan TM, Young KM, Hutson NJ, Brumley FT, Exton JH. Hepatic metabolism of genetically diabetic (db/db) mice. I. Carbohydrate metabolism. *Am J Physiol* 1975; 229(6):1702–12. doi: 10.1152/ajplegacy.1975.229.6.1702.
457. Vicario P, Brady EJ, Slater EE, Saperstein R. Insulin receptor tyrosine kinase activity is unaltered in ob/ob and db/db mouse skeletal muscle membranes. *Life Sci* 1987; 41(10):1233–41. doi: 10.1016/0024-3205(87)90201-3.
458. Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(5):E1104–13. doi: 10.1152/ajpendo.2000.279.5.E1104.
459. Nishina PM, Naggert JK, Verstuyft J, Paigen B. Atherosclerosis in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow. *Metabolism* 1994; 43(5):554–8. doi: 10.1016/0026-0495(94)90195-3.
460. KENNEDY JJ. Tubular structure of collagen fibrils. *Science* 1955; 121(3149):673–4. doi: 10.1126/science.121.3149.673.
461. Kovanen V, Suominen H, Heikkinen E. Collagen of slow twitch and fast twitch muscle fibres in different types of rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1984; 52(2):235–42. doi: 10.1007/BF00433399.
462. Lamb GD, Cellini MA. High intracellular Ca²⁺ alters sarcoplasmic reticulum function in skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 1999; 519 Pt 3:815–27. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0815n.x.
463. Moiescu DG, Thieleczek R. Calcium and strontium concentration changes within skinned muscle preparations following a change in the external bathing solution. *J Physiol* 1978; 275:241–62. doi: 10.1113/jphysiol.1978.sp012188.
464. Lamb GD, Stephenson DG. Measurement of force and calcium release using mechanically skinned fibers from mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2018; 125(4):1105–27. doi: 10.1152/jappphysiol.00445.2018.
465. Hollingworth S, Zhao M, Baylor SM. The amplitude and time course of the

- myoplasmic free Ca²⁺ transient in fast-twitch fibers of mouse muscle. *J Gen Physiol* 1996; 108(5):455–69. doi: 10.1085/jgp.108.5.455.
466. Wang X, Weisleder N, Collet C, Zhou J, Chu Y, Hirata Y et al. Uncontrolled calcium sparks act as a dystrophic signal for mammalian skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2005; 7(5):525–30. doi: 10.1038/ncb1254.
467. Stephenson DG, Williams DA. Calcium-activated force responses in fast- and slow-twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures. *J Physiol* 1981; 317:281–302. doi: 10.1113/jphysiol.1981.sp013825.
468. Granzier HL, Wang K. Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis* 1993; 14(1-2):56–64. doi: 10.1002/elps.1150140110.
469. Janes KA. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. *Sci Signal* 2015; 8(371):rs2. doi: 10.1126/scisignal.2005966.
470. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem* 2020; 593:113608. doi: 10.1016/j.ab.2020.113608.
471. Degasperi A, Birtwistle MR, Volinsky N, Rauch J, Kolch W, Kholodenko BN. Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PLoS One* 2014; 9(1):e87293. doi: 10.1371/journal.pone.0087293.
472. Murphy RM, Lamb GD. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. *J Physiol* 2013; 591(23):5823–31. doi: 10.1113/jphysiol.2013.263251.
473. Mollica JP, Oakhill JS, Lamb GD, Murphy RM. Are genuine changes in protein expression being overlooked? Reassessing Western blotting. *Anal Biochem* 2009; 386(2):270–5. doi: 10.1016/j.ab.2008.12.029.
474. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 2008; 172(2):250–4. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.05.003.
475. Kirshner ZZ, Gibbs RB. Use of the REVERT® total protein stain as a loading control demonstrates significant benefits over the use of housekeeping proteins when analyzing brain homogenates by Western blot: An analysis of samples representing different gonadal hormone states. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 473:156–65. doi: 10.1016/j.mce.2018.01.015.
476. Lee E-J, Jang HC, Koo K-H, Kim H-Y, Lim J-Y. Mechanical Properties of Single Muscle Fibers: Understanding Poor Muscle Quality in Older Adults with Diabetes. *Ann Geriatr Med Res* 2020; 24(4):267–73. doi: 10.4235/agmr.20.0078.
477. Stevens L, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett* 1999; 463(1-2):15–8. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01596-3.
478. Leite FS, Minozzo FC, Kalganov A, Cornachione AS, Cheng Y-S, Leu NA et al. Reduced passive force in skeletal muscles lacking protein arginylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 310(2):C127-35. doi: 10.1152/ajpcell.00269.2015.
479. Fauteck SP, Kandarian SC. Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions. *Am J Physiol* 1995; 268(2 Pt 1):C419-24. doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.2.C419.
480. Szigeti GP, Almássy J, Sztretye M, Dienes B, Szabó L, Szentesi P et al. Alterations in the calcium homeostasis

- of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *Pflugers Arch* 2007; 455(3):541–53. doi: 10.1007/s00424-007-0298-z.
481. Ward CW, Reiken S, Marks AR, Marty I, Vassort G, Lacampagne A. Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB J* 2003; 17(11):1517–9. doi: 10.1096/fj.02-1083fje.
482. Makarewich CA, Zhang H, Davis J, Correll RN, Trapanese DM, Hoffman NE et al. Transient receptor potential channels contribute to pathological structural and functional remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 2014; 115(6):567–80. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303831.
483. Montgomery DE, Chandra M, Huang Q, Jin J, Solaro RJ. Transgenic incorporation of skeletal TnT into cardiac myofilaments blunts PKC-mediated depression of force. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(3):H1011-8. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1011.
484. Lexell J, Jarvis JC, Currie J, Downham DY, Salmons S. Fibre type composition of rabbit tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. *J Anat* 1994; 185 (Pt 1):95–101.
485. Arbanas J, Klasan GS, Nikolic M, Jerkovic R, Miljanovic I, Malnar D. Fibre type composition of the human psoas major muscle with regard to the level of its origin. *J Anat* 2009; 215(6):636–41. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01155.x.
486. Eilertsen KJ, Keller TC. Identification and characterization of two huge protein components of the brush border cytoskeleton: evidence for a cellular isoform of titin. *J Cell Biol* 1992; 119(3):549–57. doi: 10.1083/jcb.119.3.549.
487. Eilertsen KJ, Kazmierski ST, Keller TC. Cellular titin localization in stress fibers and interaction with myosin II filaments in vitro. *J Cell Biol* 1994; 126(5):1201–10. doi: 10.1083/jcb.126.5.1201.
488. Labeit S, Lahmers S, Burkart C, Fong C, McNabb M, Witt S et al. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* 2006; 362(4):664–81. doi: 10.1016/j.jmb.2006.07.077.
489. Malafarina V, Uriz-Otano F, Iniesta R, Gil-Guerrero L. Effectiveness of nutritional supplementation on muscle mass in treatment of sarcopenia in old age: a systematic review. *J Am Med Dir Assoc* 2013; 14(1):10–7. doi: 10.1016/j.jamda.2012.08.001.
490. Trappe TA, Carrithers JA, White F, Lambert CP, Evans WJ, Dennis RA. Titin and nebulin content in human skeletal muscle following eccentric resistance exercise. *Muscle Nerve* 2002; 25(2):289–92. doi: 10.1002/mus.10037.
491. Hidalgo C, Saripalli C, Granzier HL. Effect of exercise training on post-translational and post-transcriptional regulation of titin stiffness in striated muscle of wild type and IG KO mice. *Arch Biochem Biophys* 2014; 552-553:100–7. doi: 10.1016/j.abb.2014.02.010.
492. Bellafiore M, Cappello F, Palumbo D, Macaluso F, Bianco A, Palma A et al. Increased expression of titin in mouse gastrocnemius muscle in response to an endurance-training program. *Eur J Histochem* 2007; 51(2):119–24.
493. Legerlotz K, Matthews KG, McMahon CD, Smith HK. Botulinum toxin-induced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* 2009; 39(4):472–9. doi: 10.1002/mus.21247.
494. Müller AE, Kreiner M, Kötter S, Lassak P, Bloch W, Suhr F et al. Acute exercise modifies titin phosphorylation and increases cardiac myofilament

- stiffness. *Front Physiol* 2014; 5:449. doi: 10.3389/fphys.2014.00449.
495. Gielen S, Sandri M, Kozarez I, Kratzsch J, Teupser D, Thiery J et al. Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study. *Circulation* 2012; 125(22):2716–27. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.047381.
496. Frøsig C, Jørgensen SB, Hardie DG, Richter EA, Wojtaszewski JFP. 5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286(3):E411-7. doi: 10.1152/ajpendo.00317.2003.
497. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J* 2005; 19(7):786–8. doi: 10.1096/fj.04-2179fje.
498. Layne AS, Nasrallah S, South MA, Howell MEA, McCurry MP, Ramsey MW et al. Impaired muscle AMPK activation in the metabolic syndrome may attenuate improved insulin action after exercise training. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011; 96(6):1815–26. doi: 10.1210/jc.2010-2532.
499. Hambrecht R, Fiehn E, Yu J, Niebauer J, Weigl C, Hilbrich L et al. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 1997; 29(5):1067–73. doi: 10.1016/s0735-1097(97)00015-6.
500. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 2003; 546(Pt 3):851–8. doi: 10.1113/jphysiol.2002.034850.
501. Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, Spiegelman BM et al. Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 104(5):1304–12. doi: 10.1152/jappphysiol.01231.2007.
502. Jannas-Vela S, Langer HT, Marambio H, Baar K, Zbinden-Foncea H. Effect of a 12-week endurance training program on force transfer and membrane integrity proteins in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Physiol Rep* 2020; 8(9):e14429. doi: 10.14814/phy2.14429.
503. Rivas DA, Lessard SJ, Rice NP, Lustgarten MS, So K, Goodyear LJ et al. Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling. *FASEB J* 2014; 28(9):4133–47. doi: 10.1096/fj.14-254490.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zunächst bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger für die freundliche und kompetente Unterstützung bedanken. Auch insbesondere für die Toleranz gegenüber meiner doch recht ungewöhnlichen Art, diese Arbeit aufzubauen und zusammenzustellen.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. David Barbosa für die praktische Anleitung – und dem ganzen restlichen Team insbesondere der technischen Assistentin Frau Sabine Bongardt, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben und halfen, mich bei Rückschlägen und Frustration aufzufangen.

Ich möchte auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen der Sonderforschungsgemeinschaft 1116 danken.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie Nino, Christina, Valerie, Lea, Sophia, Lena und Johanna bedanken. Auch ohne Eure Unterstützung wäre mir vermutlich nicht gelungen, dieses Projekt zum Abschluss zu bringen. Danke, dass Ihr mir zugehört, mir Mut gemacht und mir den Rücken freigehalten habt.