

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

**Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf die Skelettmuskelfunktion, das  
Sarkomerprotein Titin und die Autophagie-Prozesse im  
Skelettmuskel**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Lukas Behrendt  
2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit 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

## Zusammenfassung

Durch Übergewicht und einem Mangel an körperlicher Aktivität kann in den Skelettmuskelzellen ein Energieüberschuss entstehen, der zu einer Insulinresistenz und, bei gestörter  $\beta$ -Zellfunktion, zum Typ-2-Diabetes führen kann (Kahn et al., 2005; Szoke und Gerich, 2005; Ye, 2013). Gerade ältere Patienten mit Typ-2-Diabetes leiden allerdings häufiger, schneller und ausgeprägter an einem Verlust der Muskelmasse und -funktion (Hirata et al., 2019; Kalyani et al., 2014; Park et al., 2009; Park et al., 2007). Die genauen Mechanismen der gestörten Muskelfunktion bei metabolischen Stoffwechseländerungen und Diabetes sind noch nicht bekannt. Die physiologische Skelettmuskelfunktion setzt neben aktiver Kraftentwicklung auch eine Dehnbarkeit der Muskelzellen voraus. Diese wird vorrangig durch das Sarkomerprotein Titin definiert, welches aufgrund seiner elastischen Eigenschaften auch als molekulare Feder bezeichnet wird. Titin ist ein bis zu 4,2 Megadalton (MDa) großes Filamentprotein, welches sich mit Aktin und Myosin zusammen in den Sarkomeren von Herz- und Skelettmuskulatur befindet und dort von der Z-Scheibe bis zur M-Linie gespannt ist (Krüger und Linke, 2011). Neben seiner wichtigen Funktion in der Assemblierung des Sarkomers ist Titin an der Zentrierung der Myosinfilamente im Sarkomer beteiligt und ist ein wichtiger Interaktionspartner für Elemente der Proteinqualitätskontrolle (Ehler und Gautel, 2008; Horowitz et al., 1989; Kötter et al., 2014a). Die Auswirkung von Diabetes und Insulin auf das Sarkomerprotein Titin wurde bis jetzt hauptsächlich im Herzmuskel untersucht (Hopf et al., 2018; Krüger et al., 2010; Hamdani et al., 2013a). Vorherige Studien haben gezeigt, dass die passive Steifigkeit im Sarkomer unter anderem durch die post-translationale Phosphorylierung von Titin an der, vor allem aus Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) bestehenden PEVK-Domäne durch die Proteinkinase  $\text{Ca}$  ( $\text{PKCa}$ ) gesteigert werden kann (Hidalgo et al., 2009; Kötter et al., 2014a).

Um den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die Titin-vermittelte Skelettmuskelfunktion zu untersuchen wurden die passive Steifigkeit und aktive Kraftentwicklung an Quadriceps-Muskelproben von 36 bis 37 Wochen alten diabetischen ZSF1-*Obese* Ratten und einer Kontrollgruppe bestehend aus ZSF1-*Lean* Ratten biophysikalisch analysiert. Im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zeigten sich die passive Steifigkeit statistisch signifikant reduziert und die aktive Kraftentwicklung tendenziell vermindert.

Um die Beteiligung von Titin an der gestörten Skelettmuskelfunktion im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zu untersuchen, erfolgte die biochemische Analyse post-translationaler Modifikationen von Titin. Zusätzlich zur ZSF1-*Lean* Kontrollgruppe bestand bei den biochemischen Analysen eine weitere Gruppe aus genetisch unveränderten Wistar-Wildtyp Ratten. Hierbei zeigte sich im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine erhöhte Phosphorylierung von PEVK an S11878 und unveränderte Phosphorylierung an S12022. Die Aktivität der  $\text{PKCa}$  zeigte sich hierbei interessanterweise vermindert. Neben der  $\text{PKCa}$  kann PEVK auch durch die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II $\delta$  ( $\text{CaMKII}\delta$ ) phosphoryliert werden (Hamdani et al., 2013b; Hidalgo et al., 2013). Da  $\text{CaMKII}\delta$  bei einer Hyperglykämie, wie sie beim Typ-2-Diabetes vorkommt, bereits eine gesteigerte Aktivität zugesprochen wurde könnte es sein, dass die Phosphorylierung von PEVK im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* durch eine gesteigerte Aktivität der  $\text{CaMKII}\delta$  vermittelt wird (Erickson et al., 2013). Dass die passive Steifigkeit trotz erhöhter Phosphorylierung von PEVK an S11878 vermindert war, könnte durch eine bisher noch nicht identifizierte posttranslationale Modifikation von Titin erklärt werden.

Dem Sarkomerprotein Titin wurde bereits in mehreren Studien eine wichtige Funktion in der Proteinqualitätskontrolle und den Autophagie-Prozessen zugesprochen (Centner et al., 2001; Pizon et al., 2002; Kötter et al., 2014a). Eine geregelte Degradation der Proteinstrukturen im Sarkomer ist dabei für den Erhalt der komplexen Skelettmuskelfunktion essenziell (Mitch und Goldberg, 1996; Waterlow et al., 1978). Daher erfolgte in dieser Arbeit zusätzlich die biochemische Analyse der Titindegradation sowie zentraler Autophagie-Prozesse. Hierbei zeigte sich durch ein vermindertes *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) B II/I Verhältnis im Rattenmodell ZSF1-*Obese*, dass beim Typ-2-Diabetes eine verminderte Aktivität der Autophagie-Prozesse vorliegen könnte, welche zu einer Akkumulation von Titin im Skelettmuskel beitragen und eine gestörte Skelettmuskelfunktion im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* mitverursachen könnte (Kötter et al., 2014b). Dass sich im Vergleich zum genetisch unveränderten Wistar-Wildtyp auch im Rattenmodell ZSF1-*Lean* ein tendenziell vermindertes T2/T1 Verhältnis sowie ein statistisch signifikant reduziertes LC3B II/I Verhältnis zeigten, könnte darauf hinweisen, dass die Funktion der Autophagie-Prozesse von der genetischen Veranlagung abhängig ist und somit zum genetischen Einfluss in der Entstehung der  $\beta$ -Zellinsuffizienz und des Typ-2-Diabetes beiträgt.

## Zusammenfassung (englisch)

Obesity and a lack of physical activity can result in excess energy in skeletal muscle cells, which can lead to insulin resistance as well as type 2 diabetes if  $\beta$ -cell function is impaired (Kahn et al., 2005; Szoke und Gerich, 2005; Ye, 2013). Especially older patients with type 2 diabetes, however, suffer more frequently, faster and excessive loss of muscle mass and function (Hirata et al., 2019; Kalyani et al., 2014; Park et al., 2009; Park et al., 2007). The exact mechanisms of impaired muscle function in metabolic changes and diabetes are not yet known. In addition to active strength development, physiological skeletal muscle function also requires physiological stretchability of the muscle cells, which is mainly defined by the sarcomere protein titin. Titin, also known as a molecular spring due to its elastic properties, is a filament protein, up to 4.2 megadaltons (MDa) which is located together with actin and myosin in the sarcomeres of cardiac and skeletal muscle and extends from the Z-disk to the M-line (Krüger und Linke, 2011). Besides its important function in the assembly of the sarcomere, titin is also involved in the centering of myosin filaments in the sarcomere and is an important interaction partner for elements of protein quality control (Ehler und Gautel, 2008; Horowitz et al., 1989; Kötter et al., 2014a). The effect of diabetes and insulin on the sarcomere protein titin has so far mainly been studied in cardiac muscle (Hopf et al., 2018; Krüger et al., 2010; Hamdani et al., 2013a). Previous studies have shown that passive stiffness in the sarcomere can partly be increased by post-translational phosphorylation of titin at the, mainly composed of proline (P), glutamate (E), valine (V) and lysine (K) PEVK domain by protein kinase  $\text{Ca}$  ( $\text{PKCa}$ ) (Hidalgo et al., 2009; Kötter et al., 2014a).

To evaluate the impact of type 2 diabetes on titin-mediated skeletal muscle function, passive stiffness and active force development were analyzed biophysically in quadriceps muscle samples from 36- to 37-week-old diabetic ZSF1-Obese rats and a control group consisting of ZSF1-Lean rats. In the diabetic rat model ZSF1-Obese, passive stiffness was statistically significantly reduced and active force development was tendentially decreased.

To investigate the involvement of titin in impaired skeletal muscle function in the diabetic rat model ZSF1-Obese, biochemical analysis of post-translational modifications of titin was performed. Additionally to the ZSF1-Lean control group, the biochemical analyses included a further control group consisting of genetically unmodified Wistar wild-type rats. Here, the diabetic rat model ZSF1-Obese showed increased phosphorylation of PEVK at S11878 and unaltered phosphorylation at S12022. Interestingly,  $\text{PKCa}$  activity was shown to be reduced. In addition to  $\text{PKCa}$ , PEVK can also be phosphorylated by calcium calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  ( $\text{CaMKII}\delta$ ) (Hamdani et al., 2013b; Hidalgo et al., 2013). Considering that  $\text{CaMKII}\delta$  activity has already been reported to be increased in hyperglycemia, as occurs in type 2 diabetes, phosphorylation of PEVK in the diabetic rat model ZSF1-Obese might be mediated by increased  $\text{CaMKII}\delta$  activity (Erickson et al., 2013). Further, the fact that passive stiffness was reduced despite increased phosphorylation of PEVK at S11878 could be explained by a not yet identified posttranslational modification of titin.

Various studies have already assigned an important function in protein quality control and autophagy processes to the sarcomere protein titin (Centner et al., 2001; Pizon et al., 2002; Kötter et al., 2014a). Thereby, regulated degradation of protein structures in the sarcomere is essential for the preservation of the complex skeletal muscle function (Mitch und Goldberg, 1996; Waterlow et al., 1978). Therefore, biochemical analysis of titin degradation and central autophagy processes was also performed in this work. Here, a decreased microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) B II/I ratio in the rat model ZSF1-Obese showed that in type 2 diabetes there could be a decreased activity of autophagy processes, which could contribute to an accumulation of titin in the skeletal muscle and contribute to impaired skeletal muscle function in the diabetic rat model ZSF1-Obese (Kötter et al., 2014b). The fact that, compared to the genetically unaltered Wistar wild-type, the rat model ZSF1-Lean also showed a tendentially reduced T2/T1 ratio as well as a statistically significant reduced LC3B II/I ratio could indicate that the function of autophagy processes is genetically predisposed and thus contributes to the genetic influence in the development of  $\beta$ -cell insufficiency and type 2 diabetes.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
A-Band	Anisotropes Band
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	<i>AMP activated protein kinase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	<i>Activation-Solution</i>
ATG	<i>Autophagy related protease</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione-2-monoxime
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Carboxy
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaMKIIδ	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase IIδ
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Substratserkennungsprotein
ECL	Chemielumineszenz
EGTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erk 1	<i>Extracellular signal regulated kinase 1</i>
Erk 2	<i>Extracellular signal regulated kinase 2</i>
FN3	Fibronektin Typ III
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukose Transporter Typ 4
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
I-Band	Isotropes Band
Ig	Immunglobulin
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
kDa	Kilodalton
KLF15	<i>Krüppel-like factor 15</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LIR	<i>LC3-interacting-region</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MLP	<i>Muscle lim protein</i>

<b>mM</b>	Millimolar
<b>mTOR</b>	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
<b>MURF-1</b>	<i>Muscle RING-finger protein-1</i>
<b>N2Bus</b>	<i>N2B-Unique sequence</i>
<b>Na<sub>2</sub>CrP</b>	Creatinphosphatdinatrium
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>nm</b>	Nanometer
<b>p</b>	Überschreitungswahrscheinlichkeit
<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>PEVK</b>	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinasen
<b>PI3P</b>	Phosphatidylinositol-3-phosphat
<b>PKA</b>	cAMP-abhängigen Proteinkinase
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	Proteinkinase C $\alpha$
<b>PKG</b>	cGMP-abhängigen Proteinkinase
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>RS</b>	<i>Relaxation-Solution</i>
<b>S</b>	Serinrest
<b>s</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>SHHF</b>	<i>Spontaneously hypertensive heart failure</i>
<b>SQSTM1/p62</b>	Sequestosom-1
<b>T</b>	Threoninrest
<b>T1</b>	Titin-1
<b>T2</b>	Titin-2/ $\beta$ -Connectin
<b>TBST</b>	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>Ulk1</b>	Unc-51-like Kinase 1
<b>UPS</b>	Ubiquitin-Proteasom-System
<b>V</b>	Volt
<b>WWP1</b>	<i>WW domain–containing E3 ubiquitin protein ligase 1</i>
<b>ZDF</b>	<i>Zucker diabetic fatty</i>
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b><math>\mu</math>m</b>	Mikrometer
<b><math>\mu</math>N</b>	Mikronewton

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Typ-2-Diabetes .....	1
1.1.1 Pathophysiologie des Typ-2-Diabetes.....	1
1.1.2 Typ-2-Diabetes und Herzinsuffizienz .....	2
1.2 Skelettmuskulatur .....	3
1.2.1 Struktur der Skelettmuskulatur .....	3
1.2.2 Kontraktionsmechanismus der Skelettmuskulatur .....	5
1.2.3 Das Sarkomerprotein Titin .....	6
1.2.3.1 Struktur und Funktion von Titin .....	6
1.2.3.2 Post-translationale Modifikationen von Titin .....	8
1.2.4 Typ-2-Diabetes, die Skelettmuskulatur und das Sarkomerprotein Titin.....	9
1.3 Protein-Qualitätskontrolle im Skelettmuskel.....	10
1.3.1 Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	10
1.3.2 Autophagie-Prozesse .....	13
1.3.3 Gestörte Autophagie-Prozesse bei Typ-2-Diabetes .....	15
1.4 Ziele der Arbeit.....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Material.....	18
2.1.1 Laborgeräte.....	18
2.1.2 Utensilien .....	19
2.1.3 Chemikalien .....	19
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	21
2.1.5 Antikörper.....	24
2.1.6 Verwendete Muskelproben .....	25
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Biophysikalische Analyse .....	26
2.2.1.1 Messung der passiven Steifigkeit .....	26
2.2.1.2 Messung der calciumabhängigen Maximalkraft .....	26
2.2.2 Biochemische Analyse .....	27
2.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.2.2.2 Coomassie-Färbung.....	29
2.2.2.3 Western Blot .....	29

2.2.2.4	Antikörpervermittelte Proteindetektion.....	30
2.2.3	Software.....	30
2.2.4	Statistische Datenanalyse .....	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Analyse der Skelettmuskelfunktion bei Typ-2-Diabetes .....	32
3.1.1	Abnahme der passiven Steifigkeit des Skelettmuskels bei Typ-2-Diabetes .....	32
3.1.2	Analyse der aktiven Kraft des Skelettmuskels bei Typ-2-Diabetes .....	33
3.2	Analyse des Sarkomerproteins Titin bei Typ-2-Diabetes .....	35
3.2.1	Zunahme der PEVK-Phosphorylierung bei Typ-2-Diabetes.....	36
3.2.2	Tendenziell verminderte Aktivität der PKC $\alpha$ bei Typ-2-Diabetes.....	38
3.2.3	Analyse des T2/T1 Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes .....	40
3.3	Analyse der Autophagie-Prozesse im Skelettmuskel bei Typ-2-Diabetes .....	41
3.3.1	Senkung des LC3B II/I Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes .....	41
3.3.2	Analyse des p62/GAPDH Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes .....	42
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1	Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf die Skelettmuskelfunktion .....	44
4.2	Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin.....	47
4.3	Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf die Protein-Qualitätskontrolle .....	49
4.4	Vergleich verschiedener Auswirkungen von Typ-2-Diabetes auf Herz- und Skelettmuskulatur.....	52
4.5	Schlussfolgerungen .....	54
<b>5.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>56</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Typ-2-Diabetes

### 1.1.1 Pathophysiologie des Typ-2-Diabetes

Die Zahl der an Diabetes erkrankten Menschen wird weltweit auf 537 Millionen geschätzt und könnte bis 2045 auf 783 Millionen steigen. Von denen sind 90 % vom Typ-2-Diabetes betroffen (<https://diabetesatlas.org>, 2021). Durch verschiedene Mechanismen wie eine reduzierte Insulinwirkung oder einen absoluten Insulinmangel kommt es beim Diabetes mellitus zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel (DeFronzo et al., 2015).

Beim Typ-1-Diabetes werden durch immunologische Prozesse die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstört. Dadurch kann der Blutzuckerspiegel nicht mehr reguliert werden, was zu Hyperglykämien führt, die nur durch eine lebenslange Insulinsubstitution behandelt werden können (Katsarou et al., 2017).

In dieser Arbeit wurde der Typ-2-Diabetes untersucht, der als multifaktorielle Erkrankung sowohl von genetischen, als auch von nicht-genetischen Faktoren beeinflusst wird (Chatterjee et al., 2017). Eine Insulinresistenz geht dem Typ-2-Diabetes um mehrere Jahre voraus (Martin et al., 1992). Die Bindung von Insulin am Insulinrezeptor führt unter anderem durch eine Phosphorylierung von Tyrosin am *Insulin receptor substrate* (IRS) 1 und IRS 2 zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) (Abb. 1) (Saltiel und Kahn, 2001). PI3K unterstützt die Translokation vom Glukose Transporter Typ 4 (GLUT4) in die Plasmamembran, was die Glukoseaufnahme im Skelettmuskel ermöglicht (DeFronzo et al., 2015). Die Phosphorylierung von Tyrosin an IRS 1 und 2 wird jedoch bei Lipidakkumulationen, systemische Entzündungen oder mitochondriale Dysfunktionen durch eine Phosphorylierung von Serin an IRS gehemmt, sodass eine Insulinbindung am Insulinrezeptor nicht mehr den PI3K Signalweg auslöst und sich eine Insulinresistenz entwickelt (Bouzakri et al., 2006). Diese entsteht nicht nur im Muskel und in der Leber, sondern auch im Fettgewebe, in der Niere, im Gehirn oder in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Blázquez et al., 2014; Groop et al., 1989; Kulkarni et al., 1999; Shulman et al., 1990).

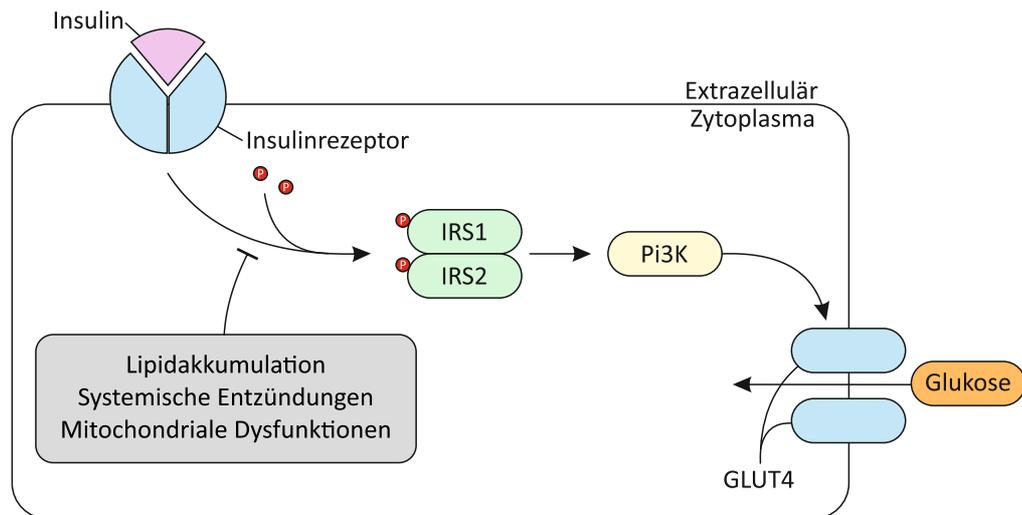


Abb. 1: **Insulinresistenz.** Die Bindung von Insulin am Insulinrezeptor führt unter anderem durch eine Phosphorylierung von Tyrosin am *Insulin receptor substrate* (IRS) 1 und 2 zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K). PI3K unterstützt die Translokation vom Glukose Transporter Typ 4 (GLUT4) in die Plasmamembran, was die Glukoseaufnahme im Skelettmuskel ermöglicht. Die Phosphorylierung von Tyrosin an IRS 1 und 2 wird jedoch bei Lipidakkumulationen, systemische Entzündungen oder mitochondriale Dysfunktionen durch eine Phosphorylierung von Serin am IRS gehemmt, sodass eine Insulinbindung am Insulinrezeptor nicht mehr den PI3K Signalweg auslöst und sich eine Insulinresistenz entwickelt.

Durch die zunehmende Insulinresistenz müssen die  $\beta$ -Zellen immer mehr Insulin produzieren, um einer Hyperglykämie entgegenzuwirken. Vor allem genetische Faktoren, aber auch das Alter können jedoch eine Insuffizienz der  $\beta$ -Zellen verursachen, die dazu führt, dass die  $\beta$ -Zellen den Insulinbedarf nicht mehr abdecken können (Szoke und Gerich, 2005; Muller et al., 1996). Die Kombination von Insulinresistenz und gestörter Insulinsekretion führen letztendlich zur Hyperglykämie und zur Entstehung von Typ-2-Diabetes.

### 1.1.2 Typ-2-Diabetes und Herzinsuffizienz

Der Typ-2-Diabetes führt neben akuten Hyperglykämien und Ketoazidosen auch zu mikro- und makrovaskulären Erkrankungen, deren Inzidenz im engen Zusammenhang mit dem Langzeit-Blutzuckerwert steht (Stratton et al., 2000). Zu den mikrovaskulären Komplikationen zählen unter anderem das diabetische Fußsyndrom, die Nephropathie, die Retinopathie und die Neuropathie (Harding et al., 2019). Zu den makrovaskulären Komplikationen zählen unter anderem die periphere arterielle Verschlusskrankheit und kardiovaskuläre Erkrankungen, darunter auch die Herzinsuffizienz. Während bei Männern mit Typ-2-Diabetes die Wahrscheinlichkeit an einer Herzinsuffizienz zu erkranken im Vergleich zu Menschen ohne Typ-2-Diabetes doppelt so hoch ist,

ist sie bei Frauen sogar fünffach erhöht (Kannel et al., 1974). Zudem haben weitere Studien gezeigt, dass bereits bei gestörter Glukosetoleranz wie beim Prädiabetes die Wahrscheinlichkeit an einer Herzinsuffizienz zu erkranken höher ist (Thrainsdottir et al., 2005). Zudem führt, bei an Typ-2-Diabetes erkrankten Patienten ein ungünstig eingestellter Blutzuckerspiegel, ein junges Alter sowie ein hoher Body-Mass-Index zu einem besonders hohen Risiko, an Herzinsuffizienz zu erkranken (Nichols et al., 2004). Patienten die sowohl an Herzinsuffizienz als auch an Typ-2-Diabetes erkrankt sind haben im Vergleich zu Patienten, die an Herzinsuffizienz ohne Typ-2-Diabetes erkrankt sind, eine höhere Hospitalisierungsrate sowie eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben (MacDonald et al., 2008; Sarma et al., 2013). Ähnlich wie beim Typ-2-Diabetes kann der Herzinsuffizienz eine Insulinresistenz vorausgehen, die zum Energiemangel, zu einer gestörten diastolischen Funktion und letztendlich zur Herzinsuffizienz führen kann (Horwich und Fonarow, 2010; Aroor et al., 2012; Riehle und Abel, 2016). Zudem kann eine kardiale Hypertrophie bei Typ-2-Diabetes als Folge der durch die Insulinresistenz ausgelösten Hyperinsulinämie, sowie durch eine Triglyceridakkumulation im Myokard auftreten (Levelt et al., 2016; Shimizu et al., 2010). Durch ihre Komorbidität, gemeinsame Risikofaktoren sowie vernetzte Pathomechanismen sind der Typ-2-Diabetes und die Herzinsuffizienz somit zwei eng miteinander verbundene Krankheitsbilder, deren Zusammenhang auch in dieser Arbeit untersucht wurde.

## 1.2 Skelettmuskulatur

### 1.2.1 Struktur der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur bildet ungefähr 40 % des Körpergewichts und ist neben der Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur einer von drei Muskulatur-Typen. Ein Skelettmuskel wird aus Muskelfaserbündeln gebildet, die jeweils von einem Perimysium umgeben werden und für die biophysikalischen Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden (Abb. 2). Muskelfaserbündel bestehen hauptsächlich aus vielkernigen, bis zu 100 µm Durchmesser breiten Muskelfasern, die für die Körperhaltung und willkürlichen Bewegungen zuständig sind, aber auch aus einzelnen einkernigen Satellitenzellen, die für die Regeneration und Reparatur bei Verletzungen notwendig sind (Hikida, 2011). Eine Skelettmuskelfaser wird vom Sarkolemm umgeben und wird aus zahlreichen Myofibrillen gebildet, die wiederum aus Sarkomeren zusammengesetzt sind, den kleinsten funktionellen Einheiten im Skelettmuskel. Ein Sarkomer wird von zwei Z-Scheiben abgegrenzt und besteht zum größten Teil aus den Myofilamenten Aktin, Myosin, Titin und Nebulin (Abb. 2). Die „dünnen Filamente“, welche vorwiegend aus Aktin bestehen und das Sarkomerprotein Titin sind in der Z-Scheibe verankert. Die „dicken Filamente“, welche vorwiegend aus Myosin bestehen, sind über Myomesin in dem M-Band genau zwischen zwei Z-Scheiben verankert und

bilden das anisotrope (A)-Band. Dort brechen die dicht aneinander gereihten Myosinfilamente das polarisierte Licht doppelt, sodass das A-Band im Mikroskop dunkel erscheint. Die Bereiche außerhalb des A-Bands, in denen Aktin und Titin ohne Myosin vorhanden sind, bilden die isotropen (I)-Bänder, die das polarisierte Licht nicht doppelt brechen und so im Mikroskop heller als das A-Band erscheinen. Die Aktinfilamente verlaufen von der Z-Scheibe bis zur H-Zone, in der kein Aktin vorhanden ist. Titin erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zum M-Band, liegt im Bereich des I-Bands frei vor und ist im Bereich des A-Bands eng an Myosin assoziiert. Nebulin erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zum Ende der Aktinfilamente an der H-Zone und ist neben der Regulierung der Länge der Aktinfilamente auch an der Stabilität und Anordnung der Myofibrillen beteiligt (Ottenheim und Granzier, 2010). Bei einer Kontraktion der Skelettmuskulatur verschieben sich Aktin und Myosin ineinander, sodass das I-Band und die H-Zone schmaler werden. Das A-Band bleibt dabei gleich groß. Bei einer Dehnung der Skelettmuskulatur verschieben sich Aktin und Myosin auseinander, sodass das I-Band und die H-Zone breiter werden. Titin wird dabei auch gedehnt und bildet analog einer physikalischen Feder elastische Rückstellkräfte, die am Ende einer Kontraktion zur Rückführung des Myosins in das Zentrum beitragen. Das A-Band bleibt dabei gleich groß (Frontera und Ochala, 2015; Mukund und Subramaniam, 2020; Pape et al., 2018).

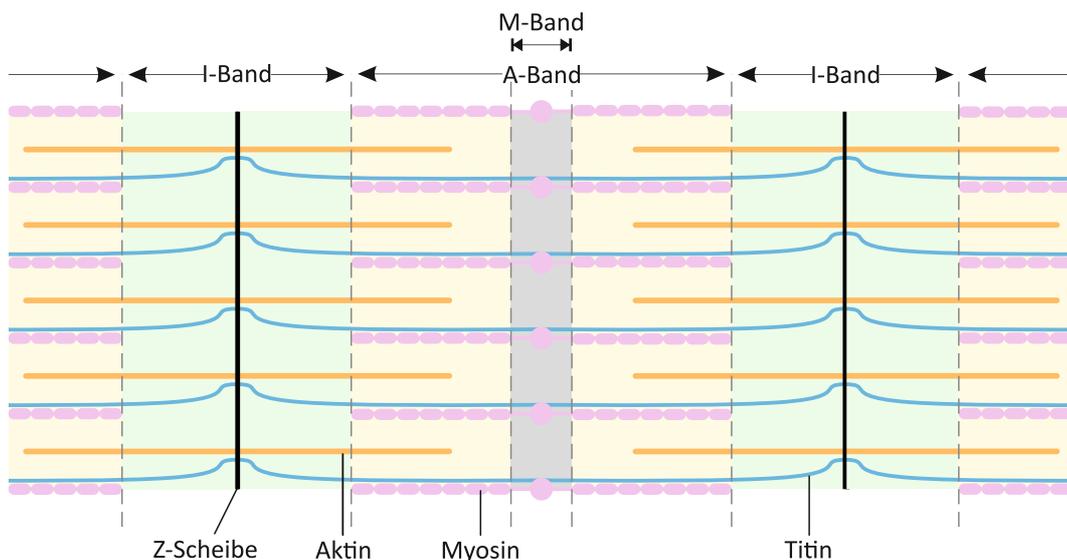


Abb. 2: **Das Sarkomer.** Ein Sarkomer wird von zwei Z-Scheiben abgegrenzt und besteht zum größten Teil aus den Myofilamenten Aktin, Myosin, Titin und Nebulin. Die „dünnen Filamente“, welche vorwiegend aus Aktin bestehen und das Sarkomerprotein Titin sind in der Z-Scheibe verankert. Die „dicken Filamente“, welche vorwiegend aus Myosin bestehen, sind in dem M-Band genau zwischen zwei Z-Scheiben verankert und bilden das anisotrope (A)-Band. Die Bereiche außerhalb des A-Bands, in denen Aktin und Titin ohne Myosin vorhanden sind, bilden die isotropen (I)-Bänder. Titin erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zum M-Band, verläuft im Bereich des I-Bands frei und im Bereich des A-Bands an Myosin entlang.

### 1.2.2 Kontraktionsmechanismus der Skelettmuskulatur

Die Kontraktion der Skelettmuskulatur wird durch die Gleitfilamenttheorie erklärt (Huxley und Hanson, 1954). Dabei gleiten die Aktinfilamente und die Myosinfilamente durch den Querbrückenzyklus ineinander, ohne dass sich deren Länge verändert. Hierzu ist der Myosinkopf zunächst mit dem Aktinfilament hochaffin gebunden. Durch die Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) am Myosinkopf löst sich der Myosinkopf vom Aktinfilament. Anschließend wird durch die Spaltung von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat der Hebelarm des Myosinkopfes gestreckt. Durch die Streckung des Hebelarms befindet sich der Myosinkopf nun an einer anderen Position gegenüber Aktin, an der er sich zunächst niederaffin bindet, und durch Strukturumlagerungen schließlich hochaffin. Nacheinander werden dann das ADP und das anorganische Phosphat vom Myosinkopf abgelöst, und der Hebelarm durch den sogenannten „Kraftschlag“ in zwei Schritten so gebeugt, dass sich das Myosinfilament am Aktinfilament verschiebt. Hier befindet sich der Myosinkopf wieder in der Ausgangssituation, und kann durch Bindung von ATP erneut vom Aktinfilament gelöst werden. Pro Zyklus verschieben sich die Filamente um etwa 10 Nanometer (nm). Durch die Wiederholung dieses Zyklus kann entweder eine Verkürzung des Muskels erreicht, oder eine Rückstellkraft aufgebaut werden (Frontera und Ochala, 2015; Pape et al., 2018).

Der Querbrückenzyklus wird Calcium-abhängig aktiviert und von den Regulatorproteinen Troponin und Tropomyosin gesteuert. Troponin-C dient als Calcium-Sensor und besitzt insgesamt vier Calcium Bindungsstellen. Unter physiologischen Bedingungen sind zwei davon besetzt und am Aktin nur die niederaffinen Bindungsstellen für die Myosinköpfe frei. Die hochaffinen Bindungsstellen werden von Tropomyosin blockiert, sodass der Querbrückenzyklus angehalten wird. In diesem Zustand kann der Muskel keine Kraft entwickeln, sodass eine Kontraktion verhindert wird und bei einer Dehnung lediglich die passiven Kräfte des Titins vorhanden sind. Bei einer Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration, wie sie nach der Freisetzung von Calcium aus den terminalen Zisternen ins Sarkoplasma durch die Fortleitung eines Aktionspotentials vorliegt, werden die zwei weiteren Bindungsstellen für Calcium besetzt. Dies hat eine Konformationsänderung des Troponins zur Folge, die zu einer Umlagerung von Tropomyosin führt. Durch die Umlagerung von Tropomyosin werden die hochaffinen Bindungsstellen an Aktin freigelegt, sodass der Querbrückenzyklus fortgesetzt werden kann (Frontera und Ochala, 2015; Pape et al., 2018).

### 1.2.3 Das Sarkomerprotein Titin

#### 1.2.3.1 Struktur und Funktion von Titin

Titin ist ein bis zu 4,2 Megadalton (MDa) großes Filamentprotein, welches sich mit Aktin und Myosin zusammen in Herz- und Skelettmuskulatur befindet und von der Z-Scheibe bis zur M-Linie reicht (Fürst et al., 1988). Es wird von einem einzigen Gen codiert, das sich auf dem langen Arm des zweiten Chromosoms befindet und 363 Exons beinhaltet (Bang et al., 2001; Rossi et al., 1994). Neben seiner wichtigen Funktion in der Assemblierung des Sarkomers ist Titin an der Zentrierung der Myosinfilamente im Sarkomer sowie an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt (Ehler und Gautel, 2008; Horowitz et al., 1989; Kötter et al., 2014a). Wegen seiner elastischen Eigenschaften wird Titin auch als molekulare Feder bezeichnet (Linke et al., 1996; Krüger und Linke, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich Skelettmuskelproben untersucht, sodass im Folgenden besonders auf die Titineigenschaften des Skelettmuskels eingegangen wird.

Die vom Titingen kodierte Aminosäuresequenz kann durch alternatives Spleißen in unterschiedlichen Titinisoformen resultieren, die sich in ihrer Größe und in ihrer Zusammensetzung unterscheiden (Freiburg et al., 2000; Labeit und Kolmerer, 1995). Die Größe von Titin beeinflusst maßgeblich die passive Steifigkeit der Muskelfaserbündel und kann von 700 Kilodalton (kDa) für die Novex-3 Isoform bis zu 3700 kDa für die N2A-Isoform im Musculus soleus reichen (Bang et al., 2001; Prado et al., 2005). Die N2A-Isoform ist die in der Skelettmuskulatur am häufigsten vorhandene Titin-Isoform und hat je nach Muskel eine Größe zwischen 3300 kDa und 3700 kDa (Abb. 3) (Prado et al., 2005). In der Herzmuskulatur kommt N2A-Titin nicht vor, dafür aber die kürzere N2B- (3000 kDa) und die etwas längere N2BA-Isoform (über 3200 kDa) (Freiburg et al., 2000).

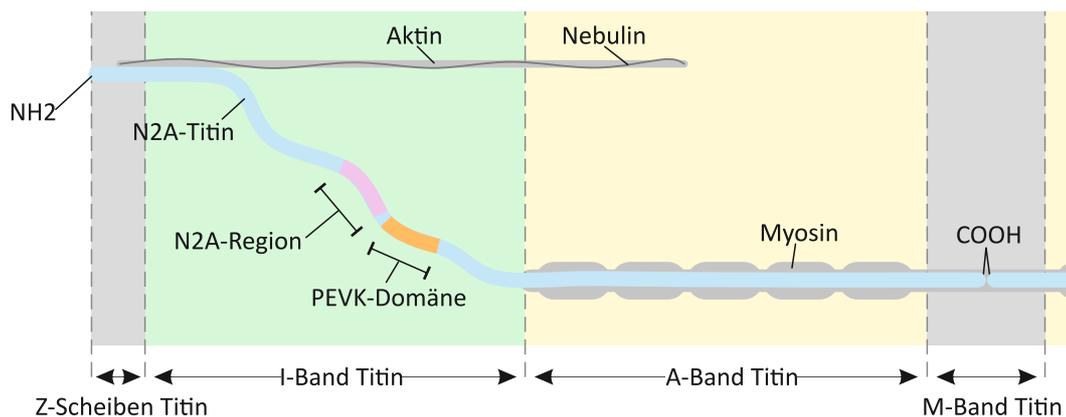


Abb. 3: **N2A-Titinstruktur.** Am NH<sub>2</sub> Terminus bilden die Immunglobulin (Ig)-Domänen Z1 bis Z9 das Z-Scheiben Titin. Im isotropen (I)-Band Titin befinden sich die N2A-Region und die PEVK-Domäne. Das anisotrope (A)-Band Titin besteht aus Ig- sowie Fibronectin Typ III (FN3)-Domänen, über die es an Myosin gebunden ist. Das M-Band Titin bindet am COOH-Terminus über Myomesin an Myosin.

Am NH<sub>2</sub> Terminus bilden die Immunglobulin (Ig)-Domänen Z1 bis Z9 das Z-Scheiben Titin, wobei nur Z1-Z4 in der Z-Scheibe verankert sind (Abb. 3) (Linke, 2008). Z1 und Z2 bilden mit Telethonin einen Komplex, der zugstabil ist und durch welchen zwei anti-parallele Titinfilamente verbunden sind (Zou et al., 2006; Lee et al., 2006). Der Z1/Z2-Telethonin Komplex bildet mit dem *muscle lim protein* (MLP) ein zentrales Element des Z-Scheiben Mechanosensors (Knöll et al., 2002). Zusätzlich zu den Ig-Domänen Z1-Z9, die in jeder Titin-Isoform konstitutiv exprimiert werden, befinden sich im Z-Scheiben Titin sogenannte *Z-Repeats*, die mit alpha-Aktinin verbunden sind, und sich je nach Muskel durch alternatives Spleißen unterscheiden (Gautel et al., 1996). Über alpha-Aktinin ist Titin bis zu 100 nm vom Zentrum der Z-Scheibe aus mit Aktin verbunden (Linke et al., 1997).

An dieser Stelle grenzt das I-Band Titin an, in welchem nur die proximale- und distale Ig-Region konstitutiv exprimiert werden (Abb. 3) (Bang et al., 2001). Die weiteren Abschnitte des I-Band Titins werden alternativ gespleißt (Krüger und Linke, 2011). Dazu gehört die N2B-Region, die neben Immunglobulinen auch eine *N2B-Unique sequence* (N2Bus) besitzt und lediglich in den kardialen Isoformen N2B und N2BA vorkommt (Linke, 2008). Die N2A-Region ist in der N2A-Isoform der Skelettmuskulatur sowie der kardialen N2BA-Isoform vorhanden und ist über die Interaktion mit der Protease Calpain-3 in der Proteinqualitätskontrolle der Skelettmuskulatur involviert (Krüger und Linke, 2011; Hayashi et al., 2008). Die überwiegend aus Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K) bestehenden PEVK-Domäne, deren Phosphorylierung zu einer erhöhten Titin-Steifigkeit führt, ist in allen Titin-Isoformen vorhanden (Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2013). Durch seine Dehnung trägt das I-Band Titin maßgeblich zur Elastizität des Sarkomers bei (Linke et al., 1996). Eine leichte Sarkomerdehnung führt zunächst zur Streckung der Ig-Regionen und der PEVK-Domäne, jedoch ohne, dass sich die Ig-Regionen ausfalten (Linke et al., 1999). Eine Ausfaltung der Ig-Region ist bei einer physiologischen Muskeldehnung unwahrscheinlich (Linke et al., 1999). In der Herzmuskulatur kann sich bei stärkeren Zugkräften auch die N2B-Region dehnen (Linke et al., 1999). Auch das Verhältnis der Isoformen N2B und N2BA, die eine unterschiedliche Länge und Elastizität haben, kann in der Herzmuskulatur die passive Steifigkeit des Sarkomers beeinflussen (Freiburg et al., 2000). Das A-Band Titin wird konstitutiv exprimiert, ist ca. 2 MDa groß und besteht aus Ig- sowie Fibronektin Typ III (FN3)-Domänen (Abb. 3) (Labeit und Kolmerer, 1995). Das A-Band Titin ist dadurch, dass es über die FN3-Domänen an Myosin gebunden ist, nicht dehnbar (Tskhovrebova und Trinick, 2004). Zusätzlich beeinflusst das A-Band Titin sowohl die Zusammensetzung als auch die Länge der Myosinfilamente (Tskhovrebova und Trinick, 2004). Das M-Band Titin besteht aus zehn Ig-Domänen, die konstitutiv gebildet werden und einer Mis-7 Insertion, die alternativ gespleißt wird (Abb. 3) (Kolmerer et al., 1996).

Das M-Band Titin interagiert über eine Bindungsstelle für die Substratserkennungsprotein (E3)-Ligase *Muscle RING-finger protein-1* (MURF-1) mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und mit

der Protease Calpain-3 (Mrosek et al., 2007; Hayashi et al., 2008). Durch einen Vorverdau von Titin ermöglichen wahrscheinlich unter anderem Calpain-Proteasen eine geregelte Protein-Qualitätskontrolle durch das UPS im Skelettmuskel (Hasselgren und Fischer, 2001; Kötter et al., 2014a). Die Titinkinase-Domäne, die durch Phosphorylierung von Tyrosin und Bindung von Calcium/Calmodulin aktiviert wird, gilt durch ihre Konformationsänderung bei mechanischem Stress als mechanischer Sensor (Mayans et al., 1998; Gräter et al., 2005). Zusätzlich bindet das M-Band Titin am COOH-Terminus über Myomesin an Myosin und verleiht so dem M-Band zusätzlich Stabilität (Agarkova und Perriard, 2005; Linke, 2008).

### 1.2.3.2 Post-translationale Modifikationen von Titin

In der Herzmuskulatur kann die Steifigkeit des Sarkomers durch die Zusammensetzung der Titin-Isoformen angepasst werden (Freiburg et al., 2000). Sowohl in der Herz- also auch in der Skelettmuskulatur besteht jedoch durch die post-translationale Phosphorylierung elastischer Titin-Domänen auch die Möglichkeit, die Steifigkeit schnell und dynamisch zu ändern (Kötter et al., 2014a). Die PEVK-Domäne, die im Titin von Skelett- und Herzmuskulatur vorkommt, kann nach bisherigem Kenntnisstand von der Proteinkinase  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) und der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) phosphoryliert werden (Abb. 4) (Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2013). Dabei werden Threonin- (T) und Serinreste (S) phosphoryliert, die zum Teil schon identifiziert wurden. Durch die PKC $\alpha$  werden S11878 und S12022 phosphoryliert (Hidalgo et al., 2009). Durch die CaMKII $\delta$  werden T12007, S12009 und S12022 phosphoryliert (Hamdani et al., 2013b). Einzelmolekülmessungen haben gezeigt, dass durch die Phosphorylierung der PEVK-Domäne die Persistenzlänge dieser Domäne verkürzt wird, was zu einer erhöhten passiven Steifigkeit des Titinmoleküls und damit auch des Sarkomers führt (Hidalgo et al., 2009).

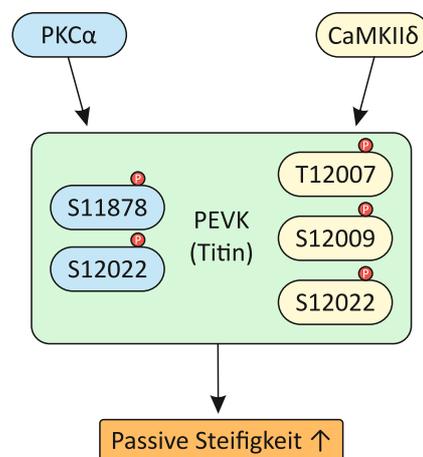


Abb. 4: **Phosphorylierung der Titin PEVK-Domäne.** Die PEVK-Domäne, die im Titin von Skelett- und Herzmuskulatur vorkommt, kann von der Proteinkinase  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) und der Calcium-Calmodulin-abhängigen

Proteinkinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) phosphoryliert werden. Durch die PKC $\alpha$  werden S11878 und S12022 phosphoryliert. Durch die CaMKII $\delta$  werden T12007, S12009 und S12022 phosphoryliert. Die Phosphorylierung der PEVK-Domäne führt zu einer erhöhten passiven Steifigkeit der Sarkomere.

In der Herzmuskulatur befindet sich im Titin zusätzlich die N2Bus-Domäne, die von der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG), der CaMKII $\delta$  und der *extracellular signal regulated kinase 1/2* (Erk 1/2) phosphoryliert werden kann (Yamasaki et al., 2002; Krüger et al., 2009; Hidalgo et al., 2013; Raskin et al., 2012). Durch die Phosphorylierung der N2Bus-Domäne wird deren Persistenzlänge verlängert, was zu einer reduzierten passiven Steifigkeit führt (Krüger et al., 2009). Der Grund, warum die Phosphorylierung der PEVK-Domäne die passive Steifigkeit erhöht, während die Phosphorylierung der N2Bus-Domäne die passive Steifigkeit reduziert, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Hypothese erklärt, dass es durch die Bindung eines negativ geladenen Phosphatrests an unterschiedlich geladenen Aminosäure-Sequenzen der PEVK- und N2Bus-Domäne zu einer intramolekularen Repulsion kommen kann, die zu den Änderungen der Persistenzlängen führt (Kötter et al., 2013).

### 1.2.4 Typ-2-Diabetes, die Skelettmuskulatur und das Sarkomerprotein Titin

Die Skelettmuskulatur kann durch eine Insulinresistenz einen starken Einfluss auf die Entstehung von Typ-2-Diabetes haben (Szoke und Gerich, 2005). Ein Energieüberschuss in den Muskelzellen soll unter anderem zur Störung der Protein-Qualitätskontrolle führen (Kahn et al., 2005; Ye, 2013). Das Sarkomerprotein Titin spielt dabei eine wichtige Funktion, welche in den folgenden Kapiteln besprochen wird (Kötter et al., 2014a).

Umgekehrt hat der Typ-2-Diabetes ebenso einen starken Einfluss auf die Skelettmuskulatur, indem es als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Skelettmuskelatrophie sowie einer Sarkopenie gilt, die ein Verlust an Muskelmasse im Alter bedeutet (Kalyani et al., 2014; Hirata et al., 2019). Bei Patienten mit Typ-2-Diabetes tritt der Verlust an Muskelmasse und -Funktion nicht nur häufiger, sondern auch schneller und exzessiver auf (Park et al., 2009; Park et al., 2007). Auch wenn der genaue Mechanismus bis jetzt noch unbekannt ist, sind die Insulinresistenz sowie die Hyperglykämie zwei wichtige Einflussfaktoren (Hirata et al., 2019). Da Insulin die Proteinsynthese sowie das Zellwachstum fördert, führt die Insulinresistenz zu einem Verlust an Muskelwachstum (James et al., 2017; Luo et al., 2006). Kalyani et al. zeigten, dass eine Hyperglykämie zu einer Verminderung der Muskelkraft führt (Kalyani et al., 2015). Eine weitere Studie zeigte, dass eine Hyperglykämie durch den *WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1* (WWP1)/*Krüppel-like factor 15* (KLF15) Signalweg Muskelatrophie verursacht (Hirata et al., 2019).

Der Einfluss von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin wurde bis jetzt hauptsächlich im Herzmuskel untersucht (Hopf et al., 2018; Krüger et al., 2010; Hamdani et al., 2013a). Es wurde gezeigt, dass Insulin in Zellkulturen embryonaler Kardiomyozyten über die Aktivierung vom PI3K/Akt Signalweg den Anteil der kürzeren und steiferen N2B-Isoform erhöhen kann und dass der Typ-1-Diabetes, bei welchem ein Insulinmangel herrscht, im Herzmuskel eines Rattenmodells zu einem reduzierten Anteil der kürzeren N2B-Isoform führt (Krüger et al., 2010). In einer weiteren Arbeit konnte in humanen Biopsien bestätigt werden, dass Insulin den Anteil der kürzeren N2B-Isoform erhöht und dass es bei Typ-2-Diabetes vermutlich durch Insulinresistenz zu einem erhöhten Anteil der längeren N2BA-Isoform im Herzmuskel kommt (Hopf et al., 2018). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Typ-2-Diabetes zu einer erhöhten Steifigkeit der Kardiomyozyten führt (Hopf et al., 2018). Dass der Typ-2-Diabetes trotz erhöhtem Anteil der größeren N2BA-Isoform zu einer erhöhten Steifigkeit der Kardiomyozyten führt, wurde durch die erhöhte Phosphorylierung von PEVK durch die gesteigerte PKC $\alpha$ -Aktivität und die verminderte Phosphorylierung von N2Bus erklärt (Hopf et al., 2018). Somit wird klar, dass sowohl die Skelettmuskulatur und das Sarkomerprotein Titin einen Einfluss auf die Entstehung von Typ-2-Diabetes hat als auch umgekehrt. Die Skelettmuskulatur, das Sarkomerprotein Titin und der Typ-2-Diabetes beeinflussen sich somit gegenseitig.

### 1.3 Protein-Qualitätskontrolle im Skelettmuskel

Um die Muskelmasse sowie die komplexe Skelettmuskelfunktion zu erhalten, ist eine geregelte dauerhafte Synthese und Degradation der Proteinstrukturen im Sarkomer essenziell (Waterlow et al., 1978; Mitch und Goldberg, 1996). Zur Qualitätskontrolle und Degradation von Proteinen im Skelettmuskel gibt es mindestens vier verschiedene Mechanismen: das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), die Autophagie-Prozesse, die Calpain- sowie die Caspase-vermittelte Degradation von Proteinen (Wing und Goldberg, 1993; Lange et al., 2005; Pankiv et al., 2007; Raynaud et al., 2005; Du et al., 2004). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Typ-2-Diabetes auf das UPS und die Autophagie-Prozesse untersucht. Diese zwei Systeme sind für die Mehrheit des proteolytischen Abbaus im Skelettmuskel verantwortlich und werden im Folgenden näher erläutert (Sandri, 2008).

#### 1.3.1 Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das UPS ist der Bestandteil der Protein-Qualitätskontrolle, der die meisten fehlgefalteten oder alten Proteine im Skelettmuskel degradiert (Rock et al., 1994). Es ist für die erhöhte Proteolyse in der katabolen Stoffwechsellage verantwortlich und bei zahlreichen Erkrankungen gestört, wie zum Beispiel bei einer Herzinsuffizienz oder einer Muskelatrophie (Wing und Goldberg, 1993;

Tsukamoto et al., 2006; Attaix et al., 2005). Die abzubauenen Substrate werden mit Polyubiquitinketten durch das Ubiquitinsystem markiert und anschließend vom 26S Proteasom abgebaut.

Hierfür wird Ubiquitin über eine Thioesterbindung an das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) kovalent gebunden, und an seinem Carboxy (C)-terminalen Glycin unter ATP-Verbrauch durch E1 aktiviert (Abb. 5) (Ciechanover, 1994; Haas und Rose, 1982). Das aktivierte Ubiquitin wird als nächstes auf ein Cysteinrest des Ubiquitin konjugierenden Enzyms (E2) übertragen (Hershko et al., 1983). E2 verbindet anschließend das aktivierte Ubiquitin über das C-terminale Glycin mit einem Lysinrest des Substrats, welches zuvor vom Substratserkennungsprotein (E3) erkannt und gebunden wurde (Ciechanover, 1994). Alternativ kann das aktivierte Ubiquitin in einem ersten Schritt von E2 an E3 übertragen werden, bevor es in einem zweiten Schritt von E3 am Substrat gebunden wird (Glickman und Ciechanover, 2002). Diese Reaktionen wiederholen sich. Die aktivierten Ubiquitine werden über Lys48 untereinander verbunden, sodass mehrere aktivierte Ubiquitine eine Polyubiquitinkette am Lysinrest des Substrats bilden (Chau et al., 1989). Die Verlängerung der Polyubiquitinkette kann unter anderem vom Sequestosome 1 (SQSTM1/p62) beeinflusst werden (Wooten et al., 2005). Hierfür bindet p62 zuerst über eine UBA-Domäne an der Polyubiquitinkette, um anschließend über die E3 Ligase TRAF6 die Verlängerung der Polyubiquitinkette zu regulieren (Hofmann und Bucher, 1996; Wilkinson et al., 2001; Wooten et al., 2005). Des Weiteren interagieren die E3 Ligasen MuRF1 und MuRF2 über die M-Band Domänen A168-170 auch mit Titin (Centner et al., 2001; Pizon et al., 2002). Sobald am abzubauenen Protein eine Polyubiquitinkette mit vier oder mehr Ubiquitinen entsteht, kann diese vom 26S Proteasom erkannt werden (Komander und Rape, 2012). Als Protein-*shuttle* für polyubiquitinierte Substrate dient hierbei unter anderem p62, welches über die PB1-Domäne mit der S5a Untereinheit des 26S Proteasoms interagiert (Seibenhener et al., 2004; Babu et al., 2005; Seibenhener et al., 2007; Lamark et al., 2003).

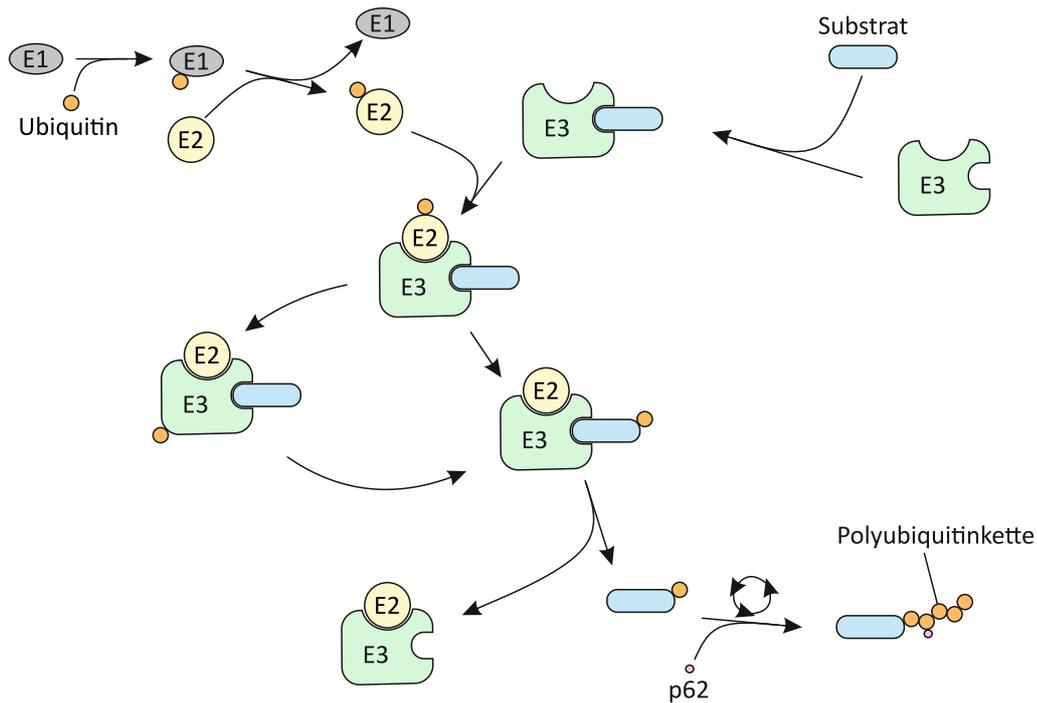


Abb. 5: **Ubiquitinierung.** Das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) aktiviert Ubiquitin. Anschließend verbindet das Ubiquitin konjugierende Enzym (E2) das aktivierte Ubiquitin mit dem Substrat, welches zuvor vom Substratserkennungsprotein (E3) erkannt und gebunden wurde. Alternativ kann das aktivierte Ubiquitin in einem ersten Schritt von E2 an E3 übertragen werden, bevor es in einem zweiten Schritt von E3 am Substrat gebunden wird. Diese Reaktionen wiederholen sich und die aktivierten Ubiquitine werden untereinander verbunden, sodass mehrere aktivierte Ubiquitine eine Polyubiquitinkette bilden. Die Verlängerung der Polyubiquitinkette kann unter anderem durch die Bindung von p62 an der Polyubiquitinkette beeinflusst werden.

Das 26S Proteasom ist eine ATP-abhängige Protease und ist für den Abbau von polyubiquinierten Substrate zuständig (Coux et al., 1996). Es besteht aus einem katalytischen 20S Komplex, welches nur von axial liegenden Poren zugänglich ist sowie ein bis zwei regulatorischen 19S Komplexen (Bard et al., 2018). Die 19S Komplexe liegen wie Kappen an den Enden des 20S Komplexes (Peters et al., 1994). Dort werden Proteine, die zuvor vom Ubiquitin-System markiert wurden, erkannt, entfaltet und durch die axial liegenden Poren zum 20S Komplex transportiert (Bard et al., 2018). Dieses besteht aus 4 Ringen, die hochzylindrisch aufeinander liegen (Kleinschmidt et al., 1983). Die zwei äußeren Ringe bestehen jeweils aus sieben  $\beta$ -Untereinheiten, die zwei inneren Ringe aus jeweils sieben alpha-Untereinheiten (Pühler et al., 1992). Im inneren der Ringe liegen die proteolytisch aktiven Zentren des Proteasoms, wo die Substrate schließlich gespalten werden (Coux et al., 1996).

### 1.3.2 Autophagie-Prozesse

Ein weiterer Bestandteil der Protein-Qualitätskontrolle sind die Autophagie-Prozesse. Diese ermöglichen über drei unterschiedliche regulierbare Mechanismen die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase und den Abbau von alten und fehlgefalteten Proteinen: die Mikroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie und die Makroautophagie (Parzych und Klionsky, 2014; Glick et al., 2010).

Bei der Mikroautophagie werden abzubauen Substrate durch Invagination der lysosomalen Membran vom Zytosol in das Lysosomlumen transportiert (Müller et al., 2000). Im Vergleich zu den anderen Autophagie-Prozessen werden bei der Chaperon-vermittelten Autophagie keine ganzen Bereiche des Zytosols abgeschnürt, sondern einzelne abzubauen Proteine an Membranrezeptoren gebunden, entfaltet und in das Lumen der Lysosomen transloziert (Cuervo und Dice, 1998; Massey et al., 2004). Die Makroautophagie unterscheidet sich unter anderem von den anderen Autophagie-Prozessen dadurch, dass die abzubauen Substrate nicht direkt am Lysosom eingefangen werden, sondern durch Vesikeln dorthin transportiert werden (Parzych und Klionsky, 2014). Dieser Autophagie-Prozess wurde in dieser Arbeit untersucht und wird fortan lediglich als „Autophagie“ bezeichnet.

Bei der Autophagie wird zunächst eine Doppelmembran gebildet, deren Ursprung möglicherweise aus der Plasmamembran, dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Komplex oder Mitochondrien kommt (Abb. 6) (Ravikumar et al., 2010; Hayashi-Nishino et al., 2009; Takahashi et al., 2011; Hailey et al., 2010). Diese Doppelmembran, die auch als Phagophore bezeichnet wird, wächst zunächst C-förmig um die abzubauen Substrate und das umgebende Zytosol bis beide Enden der Doppelmembran sich zu einem reifen Autophagosom schließen (Yang und Klionsky, 2010). Die Verlängerung der Membran erfolgt unter anderem durch den Einbau von *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) II (Hale et al., 2013). Hierfür wird pro LC3 zunächst von *autophagy related protease* (ATG) 4B zu LC3I proteolytisch gespalten und anschließend von ATG7 und ATG3 mit Phosphatidylethanolamin (PE) zu seiner aktiven Form LC3BII konjugiert (Hale et al., 2013). Das Verhältnis von LC3 II/I kann zur Untersuchung der Autophagie-Prozesse verwendet werden (Mizushima und Yoshimori, 2007). Durch die Verschmelzung eines Autophagosoms mit einem Lysosom entsteht das Autolysosom, in welchem bei einem pH-Wert von 4,5 bis 5 die lysosomalen Hydrolasen optimal funktionieren können (Mindell, 2012). Dieser pH-Wert wird von H<sup>+</sup>-ATPasen erzeugt und erhalten, die sich in der Membran der Lysosomen befinden (Ohkuma et al., 1982). Schließlich werden, nachdem die innere Membran des Autophagosoms aufgelöst wurde, das Substrat sowie die innere Membran durch die lysosomalen Hydrolasen abgebaut (Yorimitsu und Klionsky, 2005). Um die abzubauen Substrate zu erkennen und zu binden, sind Adapterproteine wie p62 oder NBR1 notwendig (Pankiv et al., 2007; Waters et al., 2009). Dabei

## Einleitung

bindet p62 über die UBA-Domäne mit den polyubiquinierten Substraten und über die *LC3-interacting-region* (LIR) mit LC3, welches in der Membran von Phagophoren eingebaut ist (Pankiv et al., 2007). Beim lysosomalen Abbau des Autophagosoms werden die Adapterprotein mit den Substraten zusammen abgebaut, was p62 zu einem möglichen Marker zur Untersuchung der Autophagie macht (Bjørkøy et al., 2005). Das UPS und die Autophagie-Prozesse können somit unter anderem über p62 interagieren und sind nicht streng getrennt, sondern als kommunizierendes und zusammenarbeitendes System zu betrachten (Kötter et al., 2014a).

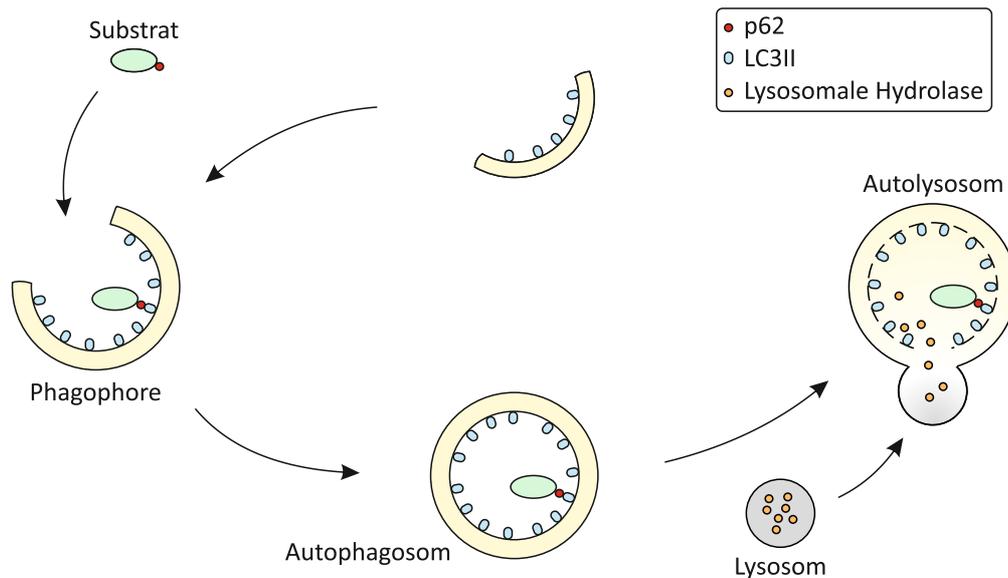


Abb. 6: **Makroautophagie**. Eine Doppelmembran, die auch als Phagophore bezeichnet wird, wächst zunächst C-förmig um die abzubauenen Substrate und das umgebende Zytosol bis beide Enden der Doppelmembran sich zu einem reifen Autophagosom schließen. Durch die Verschmelzung eines Autophagosoms mit einem Lysosom entsteht das Autolysosom. Nachdem die innere Membran des Autophagosoms aufgelöst wurde, werden das Substrat sowie die innere Membran durch die lysosomalen Hydrolasen abgebaut.

Die Regulation dieser Prozesse erfolgt nach dem aktuellen Wissenstand hauptsächlich durch zwei bekannte Mechanismen (Abb. 7). Bei ausreichender Nährstoffzufuhr wird die Autophagie gehemmt. Hierzu hemmt das *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) die Proteinkinase *unc-51-like kinase 1* (Ulk1) durch Phosphorylierung von Ser757 (Kim et al., 2011). Unter Nährstoffdeprivation wird die Autophagie hingegen induziert. Hierzu aktiviert die *AMP activated protein kinase* (AMPK) Ulk1 durch Phosphorylierung von Ser317 und Ser777 (Kim et al., 2011). Gleichzeitig wird mTOR gehemmt, um die Phosphorylierung von Ser757 und somit die Hemmung von Ulk1 zu verhindern (Kim et al., 2011). Bemerkenswert ist, dass die Hemmung von mTOR unter Aminosäuremangel ausreichend ist, um Ulk1 AMPK-unabhängig zu aktivieren (Kim et al., 2011). Neben der Phosphorylierung von Ulk1 ist für die Induktion der Autophagie auch die

Phosphorylierung von Beclin-1 an Thr388 durch Ulk1 oder direkt durch AMPK notwendig (Zhang et al., 2016). Beclin-1 ist mit weiteren Proteinen zusammen Bestandteil des Klasse-III-phosphatidylinositol-3-Kinase-Komplex, welches Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) produziert, ein spezifisches Molekül der Autophagosommembran (Liang et al., 1999; Obara et al., 2008).

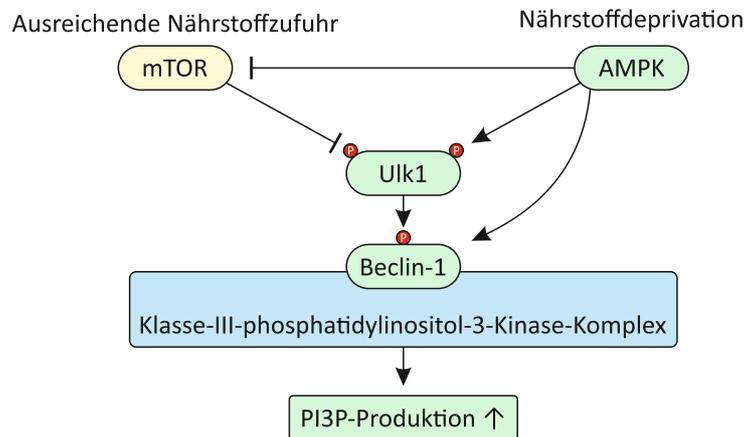


Abb. 7: **Regulation der Autophagie-Prozesse.** Bei ausreichender Nährstoffzufuhr wird die Proteinkinase *unc-51-like kinase 1* (Ulk1) vom *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) gehemmt. Unter Nährstoffdeprivation wird Ulk1 jedoch von der *AMP activated protein kinase* (AMPK) aktiviert und mTOR gehemmt, sodass Beclin-1 entweder von Ulk1 oder direkt von AMPK phosphoryliert werden kann. Das Klasse-III-phosphatidylinositol-3-Kinase-Komplex, zu welchem Beclin-1 gehört, produziert anschließend Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P), ein spezifisches Molekül der Autophagosommembran.

### 1.3.3 Gestörte Autophagie-Prozesse bei Typ-2-Diabetes

Die Störung von Autophagieprozessen wird unter anderem mit der Entstehung der Insulinresistenz und der gestörten  $\beta$ -Zellfunktion beim Typ-2-Diabetes in Verbindung gebracht (Marasco und Linnemann, 2018; Ruderman et al., 2013).

Übergewicht und ein Mangel an körperlicher Aktivität können zu einem Energieüberschuss in den Zellen führen und sind zwei der wichtigsten Risikofaktoren für Typ-2-Diabetes (Wu et al., 2014). Bei einem Energieüberschuss in der Zelle steigt die mitochondriale ATP-Produktion, was die AMPK-Aktivität hemmt und somit auch die Signalwege, die von der AMPK gesteuert werden (Kahn et al., 2005; Ye, 2013). Die Hemmung der AMPK-Aktivität könnte für die Entstehung der Insulinresistenz beim Typ-2-Diabetes verantwortlich sein (Ruderman et al., 2013). Pharmakologische Substanzen wie Metformin oder Glitazone, die beim Typ-2-Diabetes eingesetzt werden, führen zu einer Aktivierung der AMPK und wirken diesem Mechanismus entgegen (Saha et al., 2004; Zhou et al., 2001).

Die Entstehung und Verstärkung der Insulinresistenz führt durch einen erhöhten Insulinbedarf zu einer erhöhten Insulinsekretion und  $\beta$ -Zellmasse (Rahier et al., 2008). Diese Bedingungen führen in den  $\beta$ -Zellen zu oxidativem Stress sowie Stress des endoplasmatischen Retikulums, die eine  $\beta$ -Zellinsuffizienz begünstigen (Ogihara und Mirmira, 2010). Zellen können jedoch durch funktionierende Autophagie-Prozesse sowohl vor oxidativem Stress als auch vor Stress des endoplasmatischen Retikulums geschützt werden, sodass die Insulinresistenz nicht zwingend zur  $\beta$ -Zellinsuffizienz führen muss (Kroemer et al., 2010). Bei gestörter Autophagie kommt es durch den oxidativen Stress und den Stress des endoplasmatischen Retikulums jedoch zu einer  $\beta$ -Zellinsuffizienz (Watada und Fujitani, 2015).

Auch wenn der genaue Zusammenhang zwischen den Autophagie-Prozessen und der Entstehung des Typ-2-Diabetes noch nicht vollständig geklärt ist, sind beide Mechanismen durch die Interaktion gemeinsamer Schlüsselkomponenten eng miteinander vernetzt.

### 1.4 Ziele der Arbeit

Patienten mit Typ-2-Diabetes leiden häufiger, schneller und ausgeprägter an einem Verlust der Muskelmasse und -Funktion (Hirata et al., 2019; Kalyani et al., 2014; Park et al., 2009; Park et al., 2007). Dabei soll die Insulinresistenz das Muskelwachstum hemmen und die Hyperglykämie zu einer Muskelatrophie sowie Verminderung der Muskelkraft führen (James et al., 2017; Luo et al., 2006; Hirata et al., 2019; Kalyani et al., 2015). Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die Skelettmuskelfunktion zu untersuchen. Hierfür sollte die passive Steifigkeit und aktive Kraftentwicklung biophysikalisch an Quadriceps-Muskelproben von diabetischen ZSF1-*Obese* Ratten und einer Kontrollgruppe von ZSF1-*Lean* Ratten untersucht werden. Beim diabetischen ZSF1-*Obese* Rattenmodell entsteht eine Glukoseintoleranz durch eine homozygote Genmutation und eine anhaltende Hyperglykämie. Das ZSF1-*Lean* Rattenmodell hat eine heterozygote Genmutation, die kein Übergewicht verursacht.

Da der Einfluss von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin bis jetzt hauptsächlich im Herzmuskel untersucht wurde, war es auch ein Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin in der Skelettmuskulatur zu untersuchen (Hopf et al., 2018; Krüger et al., 2010; Hamdani et al., 2013a). Um den Zusammenhang zwischen eventuelle Änderungen der Kraftentwicklung im ZSF1-Rattenmodell und dem Sarkomerprotein Titin in der Skelettmuskulatur besser zu verstehen, sollte zudem die PKC $\alpha$  vermittelte Phosphorylierung der zwei Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022 in der Titin-PEVK Region biochemisch analysiert werden. Zusätzlich zur ZSF1-*Lean* Kontrollgruppe bestand bei den biochemischen Analysen eine weitere Gruppe aus genetisch unveränderten Wistar-Wildtyp Ratten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die muskuläre Qualitätskontrolle und Degradation der Proteinstrukturen zu untersuchen, welche für den Erhalt der Skelettmuskelfunktion essenziell sind (Mitch und Goldberg, 1996; Waterlow et al., 1978). Titin wurde bereits in mehreren Studien eine wichtige Funktion in der Protein-Qualitätskontrolle zugesprochen (Centner et al., 2001; Pizon et al., 2002; Kötter et al., 2014a). Aus diesem Grund sollte zunächst die Degradation von Titin anhand des T2/T1 Verhältnisses durch SDS-PAGE untersucht werden. Der Energieüberschuss in der Zelle, wie er beim Typ-2-Diabetes vorliegt, kann zu einer verminderten Aktivität der Autophagie-Prozesse führen, welche Bestandteil der Protein-Qualitätskontrolle sind (Ye, 2013). Um den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die Autophagie-Prozesse in der Skelettmuskulatur zu analysieren, sollte daher zusätzlich die relative Expression der zwei Autophagie-Marker p62 und LC3B II immunhistochemisch analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Die in Tabelle 1 angegebenen Laborgeräte wurden während der Durchführung der praktischen Arbeiten nach den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 1: **Laborgeräte**

<b>Laborgerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Modell</b>
Binocular	Leica	S8AP0
Blotting-Apparatur	Biorad	Trans-Blot Turbo
Computer (Büro)	HP	Elitedesk
Computer (Imager)	HP	Elitedesk
Computer (Kraftmessungen)	Chieftec	5237526
Eismaschine	Ziegra	Keine Angabe
Eisschrank – 20 °C	Liebherr	Premium nofrost
Eisschrank – 80 °C	Thermo scientific	Revco uxf
Feinwaage	Mettler	Ae 163
Gelelektrophoresesystem 1	Biorad	Mini Protean
Gelelektrophoresesystem 2	Biometra	Mini Twin
Imager	Vilber	Fusion fx
Fasermessapparatur	Myotronic Heidelberg	Standa 074284
Kühlschrank + 4 °C	Liebherr	Profiline
Mikrowelle	AEG	Micromat
Monitore	HP	V243
pH Elektrode	Mettler toledo	Mp220
Photometer	Pharmacia Biotech	Ultrospec 1000
Powerpack	Biometra	Standard power pack
Rollmischer	CAT	Rw10w 30v
Rührer	Ika	Rct Basic
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer compact
Universalschüttler	Edmund Bühler GmbH	Sm-30
Vortexer (für Bradford)	Heidolph	Reax top
Vortexer 2	Scientific Industries	Vortex Genie 2

## Material und Methoden

Waage	Kern	572
Wasserbad	Kottermann	3043
Zentrifuge	VWR	Mini Star Silverline

### 2.1.2 Utensilien

Die in Tabelle 2 angegebenen Utensilien wurden während der Durchführung der praktischen Arbeiten nach den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2: Utensilien

Utensil	Hersteller	Modell
Eppendorf Gefäße	Eppendorf	Safe lock tubes
Falcon	Cellstar	15 Milliliter (ml) 188271 50 ml 227261
Küvetten	Sarstedt	67.742
Pinzette	Meyer inox Germany	Keine Angabe
Pipetten	Eppendorf, Gilson	Research, pipetman
Pipettenspitzen	Starlab	Tipone
Skalpelle	Feather	Disposable Scalpel
Uhrglas	Duran Group	Soda lime

### 2.1.3 Chemikalien

Die in Tabelle 3 angegebenen Chemikalien wurden während der Durchführung der praktischen Arbeiten nach den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
2,3-Butanedione-2-monoxime (BDM)	Sigma Aldrich
Acrylamid 1:29	Biorad
Acrylamid 1:32,5	Roth
Agarose	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Applichem
B-Glycerophosphat	Sigma Aldrich

## Material und Methoden

---

Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific
Bradford Reagenz	Sigma Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich
Creatinphosphatdinatrium (Na <sub>2</sub> CrP)	Applichem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol	VWR
Ethylendiamintetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich
Glycerol 10 %	Sigma Aldrich
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid 6 Molar (M)	Applichem
Imidazol	Sigma Aldrich
Imperial Protein Stain	Thermo Scientific
Isopropanol	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich
Methanol	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> ATP	Applichem
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
SDS 3 %	Applichem
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Nonident P40 0,2 %	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
Salzsäure (HCl) 32 %	VWR
Serva Blue	Serva-Electrophoresis
Natriumfluorid	Sigma Aldrich
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
Temed	Applichem
Thiourea	Applichem
Tricine	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth

## Material und Methoden

Triton	Appllichem
Tween20	Sigma Aldrich
Urea	Sigma Aldrich
Westar-C-Ultra-Lösung	Cyanagen

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Die in Tabelle 4 angegebenen Puffer und Lösungen wurden während der Durchführung der praktischen Arbeiten verwendet. Deren Zusammensetzung ist ebenfalls in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
<b>Activation-Solution (AS)</b>	1 ml 1 M Imidazol 1,2 ml 250 Millimolar (mM) Ca <sup>2+</sup> EGTA 20 ml Na <sub>2</sub> MgATP 3 ml 100 mM MgCl <sub>2</sub> 1,56 (Gramm) g Na <sub>2</sub> CrP 200 (Mikroliter) µl 1 M DTT
<b>Agarose 1,5 % (400 ml)</b>	6 g Agarose 400 ml destilliertes Wasser (H <sub>2</sub> O)
<b>Anodenpuffer (1 l):</b>	36,3 g 300 mM Tris 17,9 g 100 mM Tricine pH 8,8 einstellen
<b>AS-Lösung:</b>	10 ml <i>Activation-Solution</i> 1 Aliquot DTT
<b>BSA-Tris-buffered saline with Tween20 (TBST)</b>	2 %: 10 g BSA in 500 ml 1 x TBST 0,5 %: 2,5 g BSA in 500 ml 1 x TBST 0,5 %: 50 ml 2 % BSA in 150 ml TBST
<b>Ca<sup>2+</sup> EGTA Lösung 250 mM (100 ml)</b>	9,509 g EGTA 3,672 CaCl <sub>2</sub> pH 7,0 einstellen
<b>EGTA Lösung 250 mM (100 ml)</b>	9,509 g EGTA 3,73 g KCl pH 7,0 einstellen
<b>Kathodenpuffer (1 l):</b>	39,35 g 300 mM Aminocaprinsäure

## Material und Methoden

---

	3,63 g 30 mM Tris pH 8,7 einstellen
<b>Laufpuffer 10 x (1 l)</b>	30,3 g 250 mM Tris 150,14 2 M Glycin 10 g 1 % SDS pH sollte über 8,3 liegen. Nicht einstellen.
<b>Na<sub>2</sub>MgATP 50 mM (100 ml)</b>	2,755 g Na <sub>2</sub> ATP 1,02 g MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O pH 7,0 einstellen
<b>Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich) (50 ml):</b>	1,050 g Natriumfluorid 0,092 g Natriumorthovanadat 2,230 g Natriumpyrophosphat 1,531 g Decahydrat B-Glycerophosphat
<b>Polyvinylidenfluorid (PVDF) Destain (1 l):</b>	100 ml Essigsäure 400 ml Ethanol 500 ml destilliertes Wasser
<b>Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich):</b>	1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail in 2 ml H <sub>2</sub> O lösen
<b>PVDF Stain (200 ml):</b>	150 Milligramm (mg) 0,075 % Serva Blue 200 ml Methanol
<b>Relaxation-Solution (RS) (100 ml)</b>	1 ml 1 M Imidazol 1,2 ml 250 mM EGTA 20 ml Na <sub>2</sub> MgATP 3 ml 100mM MgCl <sub>2</sub> 1,56 g Na <sub>2</sub> CrP 200 µl 1 M DTT
<b>RS Lösung ohne BDM:</b>	10 ml <i>Relaxation-Solution</i> 1 Aliquot DTT 1 Aliquot Protease Inhibitor Cocktail 1 Aliquot Phosphatase Inhibitor Cocktail
<b>RS Lösung:</b>	10 ml <i>Relaxation-Solution</i> 1 Aliquot BDM 1 Aliquot DTT 1 Aliquot Protease Inhibitor Cocktail

---

## Material und Methoden

---

	1 Aliquot Phosphatase Inhibitor Cocktail
<b>Sammelgel (4 %):</b>	70,667 ml Acrylamid/Bis 29% 3,025 ml Millipore Wasser 1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer 15 µl Temed 50 µl APS
<b>Sammelgelpuffer 4 x</b>	0,5 M Tris pH 6,8 einstellen 0,4 % SDS
<b>Skimming Lösung / 2 % Tritonlösung:</b>	1 ml 10 % Triton Lösung in 4 ml RS Lösung
<b>Stripping-Puffer (1 l):</b>	57,32 g 6 M Guanidinhydrochlorid 0,242 20 mM Tris 200 µl Nonident 0,2 % P40 pH 7,5 einstellen 750 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol in 100 ml Puffer mischen.
<b>TBST 10x (1 l)</b>	24,23 g 0,2 M Tris 87,66 g 1,5 M NaCl 10 ml 1 % Tween pH 7,4 einstellen
<b>Titingel (2,1 %):</b>	1,40 ml Acrylamid/Bis 37,5 % 6,67 ml destilliertes Wasser 5 ml Trenngelpuffer 100 µl SDS 20 % 11,5 µl Temed 150 µl APS 6,67 ml Agarose 1,5 %
<b>Titinprobenpuffer (50 ml):</b>	24 g 8 M Urea 7,6 g 2 M Thiourea 12 ml TRIS (50 mM: 1,2114 g Tris/200 ml destilliertes Wasser pH = 6,8) 1,5 g 3 % SDS 15 mg 0,035 Serva Blue 5 ml 10 % Glycerol

---

## Material und Methoden

	Auf 50 ml mit 50 mM Tris auffüllen
<b>Trenngel (10 %):</b>	5 ml Acrylamid/Bis 29 % 6,25 ml destilliertes Wasser 3,75 ml 4 x Trenngelpuffer 7,5 µl Temed 75 µl APS
<b>Trenngel (15 %):</b>	7,5 ml Acrylamid/Bis 29 % 3,75 ml destilliertes Wasser 3,75 ml 4 x Trenngelpuffer 7,5 µl Temed 75 µl APS
<b>Trenngelpuffer 4 x (500 ml):</b>	90,88 g 1,5 M Tris 400 ml destilliertes Wasser pH 8,8 einstellen. 2 g 0,4 % SDS Auf 500 ml auffüllen
<b>Tritonlösung (0,5 %):</b>	0,25 ml 10 % Triton Lösung in 4,75 ml RS Lösung
<b>Tritonlösung (10 %):</b>	1 ml Triton in 9 ml RS Lösung

Der pH wurde mit HCl (32 %) und mit NaOH (1 M) eingestellt.

### 2.1.5 Antikörper

Die in Tabelle 5 angegebenen Antikörper wurden für die Immunfärbung verwendet. Die in den Versuchen verwendete Verdünnung ist ebenfalls in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Quelle	Hersteller, Referenz
LC3B	1:2000	Kaninchen	Cell Signalling, 2775
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	1:10000	Maus	Sigma, G8795
PEVK phospho S11878	1:1000	Kaninchen	Eurogentec, S11878
PEVK phospho S12022	1:2000	Kaninchen	Eurogentec, S12022
PEVK <i>total</i>	1:2000	Kaninchen	Eurogentec, SY4638
PKCα phospho T497	1:5000	Kaninchen	Abcam, ab76016

## Material und Methoden

---

PKC $\alpha$ total	1:10000-50000	Kaninchen	Abcam, ab32376
SQSTM1/p62	1:2000	Maus	Abcam, ab56416
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Anti-Kaninchen	1:5000	Ziege	Cell Signalling, 7074
Anti-Maus	1:5000	Pferd	Cell Signalling, 7076

### 2.1.6 Verwendete Muskelproben

Im Rahmen der hier präsentierten praktischen Arbeiten wurden weder Tierversuche noch Tiertötungen vorgenommen. Die Muskelproben wurden von Kooperationspartnern der Bayer AG in Wuppertal zur Verfügung gestellt. Tierversuchsgenehmigungen für die verwendeten Proben liegen vor (N0400A222 „Prüfung von Substanzen bzgl. Ihrer Wirkung auf den Verlauf der Erkrankung in diabetischen Modellen mit Endorganschäden“).

Die Versuche wurden an schockgefrorenen Quadrizeps-Muskelproben von insgesamt drei Tiergruppen durchgeführt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Tiere im Alter von 36 – 37 Wochen von Charles River (Customer Service USA) bezogen und mit Purina Diet (#5008) gefüttert. Eine Gruppe bestand aus n = 6 diabetischen ZSF1-*Obese* Ratten. Hierbei handelt es sich um eine Kreuzung zwischen weiblichen ZDF (*Zucker diabetic fatty*) und männlichen SHHF (*spontaneously hypertensive heart failure*) Ratten. Das ZSF1-*Obese* Rattenmodell hat eine homozygote fa Mutation (fa/fa) im Leptinrezeptor-Gen, welche Hyperphagie und Übergewicht verursacht (Zucker und Zucker, 1961). Eine Glukoseintoleranz der ZSF1-*Obese* Ratten entstand im Alter von 10-12 Wochen durch eine anhaltende Hyperglykämie (> 300 mg/dl). Bei ZSF1-*Obese* Ratten sind Übergewicht, Hyperglykämie, Glukosurie, Polyurie, Polydipsie, Proteinurie sowie eine erhöhte Insulinresistenz beschrieben worden (Hamdani et al., 2013a). In 20 Wochen alten ZSF1-*Obese* Ratten konnte bereits in vorangegangenen Studien eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion nachgewiesen werden (Hamdani et al., 2013a). Die Kontrollgruppe bestand aus n = 6 ZSF1-*Lean* Ratten von Charles River Laboratories. Das ZSF1-*Lean* Rattenmodell hat eine heterozygote fa Mutation (fa/+) im Leptinrezeptor-Gen, welche keinen Übergewicht verursacht (Zucker und Zucker, 1961).

Eine weitere Gruppe bestand aus n = 4 Wistar-Wildtyp-Ratten als Kontrollgruppe ohne genetisch veränderten Hintergrund.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Biophysikalische Analyse

#### 2.2.1.1 Messung der passiven Steifigkeit

Um die passive Steifigkeit kleiner Muskelfaserbündel zu analysieren, wurde die passive Zugspannung in Abhängigkeit der Faserdehnung mithilfe der Fasermessapparatur Muscle-Station-Skinned (Fa. Myotronic) und der Software MyoDat gemessen. Durch das in der RS-Lösung enthaltene BDM wurde die Myosin ATPase gehemmt und so eine aktive Kraftentwicklung der Muskelfasern verhindert.

Zunächst wurden die Muskelfasern für die Messung präpariert. Hierzu wurden die Muskelproben für zwei Stunden in einer 2 % Triton Skinning-Lösung auf einem Universalschüttler unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Probengefäße lagen dabei auf Eis. Danach wurden die gehäuteten Muskelproben drei Mal für 15 Minuten mit RS-Lösung gewaschen, um das Detergenz Triton zu entfernen. Anschließend wurden mithilfe von zwei Pinzetten und eines Skalpell unter dem Binocular einzelne Muskelfaserbündel präpariert und in der Fasermessapparatur mithilfe von Metallankern eingespannt. Dabei war ein Anker am Längengeber der Fasermessapparatur befestigt, der andere am Kraftmesser. Um die Ruhelänge der Faserbündel zu bestimmen, wurden die einzelnen Muskelfaserbündel durch Bewegung des Längengebers genau so weit gedehnt, dass noch keine passive Zugspannung am Kraftmesser gemessen werden konnte. Anhand dieser Ruhelänge wurden dann die fünf Dehnungsschritte festgelegt, bei denen die Muskelfasern auf insgesamt 150 % ihrer Ruhelänge gedehnt wurde. Das aufgespannte Muskelfaserbündel wurde in die RS-Lösung überführt und die einzelnen Schritte in der MyoDat Software eingegeben. Das Protokoll wurde anschließend drei Mal nacheinander ausgeführt und die passive Zugspannung dabei für jeden Dehnungsschritt gemessen. Am Ende jeden Protokolls wurden die Muskelfasern auf ihre Ruhelänge zurückgebracht und der Durchmesser des Faserbündels mithilfe eines Objektmikrometers bestimmt. Der Durchmesser der Muskelfaserbündel lag durchschnittlich bei etwa 280  $\mu\text{m}$ . Die Kraftdaten der passiven Zugspannung wurden anschließend auf den Faserdurchmesser normalisiert.

#### 2.2.1.2 Messung der calciumabhängigen Maximalkraft

Die Messung der calciumabhängigen Maximalkraft kleiner Muskelfaserbündel erfolgte im Anschluss an die Messung der passiven Zugspannung in Abhängigkeit der Faserdehnung.

Um eine aktive Kraftentwicklung zu ermöglichen wurde das aufgespannte Muskelfaserbündel anschließend für zehn Minuten in RS-Lösung ohne BDM inkubiert. Es wurde kontrolliert, dass sich das Muskelfaserbündel in seiner Ruhelänge befindet. Um die calciumabhängige Maximalkraft zu

messen, wurde das Muskelfaserbündel dann um etwa 10 % seiner Ruhelänge vorgedehnt und nach einer kurzen Entspannungsphase in die calciumhaltige AS-Lösung mit pCa 4,5 überführt. Dadurch wurde eine maximale Kontraktion der Muskelfasern ausgelöst. Sobald die gemessene Kraft ein Plateau erreichte, wurde das Muskelfaserbündel wieder für eine Minute in die RS-Lösung ohne BDM überführt. Dadurch wurde die Relaxation der Muskelfasern induziert. Diese Messung wurde für jedes Muskelfaserbündel drei Mal durchgeführt. Die Werte der calciumabhängigen Maximalkraft konnten nach jeder Messung abgelesen und für die Auswertung der Daten verwendet werden. Schließlich wurde unter dem Binocular mithilfe eines Objektmikrometers der Durchmesser des Faserbündels gemessen.

### 2.2.2 Biochemische Analyse

#### 2.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen, wurde die SDS-PAGE verwendet.

Nach Zugabe eines mit DTT vermengten SDS-Probenpuffers wurden die Muskelproben mit einem Skalpell mechanisch auf einem Uhrglas zerkleinert. Um die Proteine vollständig zu denaturieren, wurden die in Eppendorf-Gefäßen zwischengelagerten Proben anschließend drei Minuten lang bei 96 Grad Celsius (°C) erhitzt und drei Minuten lang zentrifugiert. Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mithilfe des Bradford-Tests. Die Gelelektrophoresesysteme Mini Protean von Biorad und Mini Twin von Biometra wurden für die Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe verwendet.

Proteine, die kleiner sind als Titin, wurden mit dem diskontinuierlichen Lämmli-System nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurde zwischen zwei mit Silikon abgedichteten Glasplatten zunächst ein Acrylamid-Trenngel gegossen. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels ist von der Molekülmasse des zu analysierenden Proteins abhängig. Um die Polymerisierung des Trenngels zu ermöglichen, wurde dieses unter Abschluss von Sauerstoff mit Isopropanol 30 Minuten lang zwischengelagert.

Um den Phosphorylierungszustand der PKC $\alpha$  zu analysieren, wurden 10 % Acrylamid-Trenngele verwendet. Um die Autophagie-Marker LC3B, SQSTM1/p62 und GAPDH des Skelettmuskels zu analysieren, wurden 15 % Acrylamid-Trenngele verwendet.

Anschließend wurden das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet. Um die Polymerisierung des Sammelgels zu ermöglichen, wurde dieses 30 Minuten lang zwischengelagert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. In dem mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresesystem wurden die SDS-Protein-Komplexe bei einer Stromstärke von 15-30 Milliampere (mA) pro Gel aufgetrennt.

## Material und Methoden

Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: **Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>10 % Acrylamid-Trenngele</b>	<b>15 % Acrylamid-Trenngele</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid 29 % (ml)	5	7,5	70,667
Destilliertes Wasser (ml)	6,25	3,75	3,025
Trenngelpuffer 4 x (ml)	3,75	3,75	/
Sammelgelpuffer 4 x (ml)	/	/	1,25
Temed ( $\mu$ l)	7,5	7,5	15
APS ( $\mu$ l)	75	75	50
<b>Gesamtvolumen (ml)</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>5</b>

Das Sarkomerprotein Titin wurde aufgrund seiner hohen Molekülmasse mit einem speziellen agarosestabilisierten Titingel mit einem Acrylamidanteil von 2,1 % aufgetrennt.

Vor der Herstellung der Gele wurden zwei Glasplatten mit Silikon und zusätzlich heißer Agarose abgedichtet. Um das Titingel herzustellen, wurden alle Bestandteile des Gels bis auf APS und Agarose in einem Falcon gemischt. Dieses wurde anschließend in einem 60 °C heißen Wasserbad zwischengelagert. Sobald die Temperatur im Falcon 48 °C erreichte, wurde zügig das APS und die unmittelbar davor in der Mikrowelle erhitzte Agarose hinzugegeben. Der gesamte Inhalt des Falcons wurde gemischt. Anschließend wurde das Titingel zwischen die zwei Glasplatten gegossen. Um die vollständige Polymerisierung des Titingels zu ermöglichen, wurde dieses für mindestens zwei Stunden zwischengelagert. Schließlich wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. In dem mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresesystem wurden die SDS-Protein-Komplexe bei einer Stromstärke von 2 - 4 mA pro Gel aufgetrennt.

Die Zusammensetzung der Titingele ist in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7: **Zusammensetzung der Titingele**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>2,1 % Acrylamid-Titingel</b>
Acrylamid 37,5 % (ml)	1,40
Destilliertes Wasser (ml)	6,67
Trenngelpuffer 4 x (ml)	5
SDS 20 % ( $\mu$ l)	100
Temed ( $\mu$ l)	11,5
APS ( $\mu$ l)	150

## Material und Methoden

---

Agarose 1,5 % (ml)	6,67
<b>Gesamtvolumen (ml)</b>	<b>20</b>

---

### 2.2.2.2 Coomassie-Färbung

Um das Titin T2/T1 Verhältnis zu analysieren, wurden die Proteine auf den Titingelen, nachdem die SDS-PAGE durchgeführt wurde, mit Imperial Protein Stain gefärbt. Es handelt sich hierbei um ein Proteinfärbemittel mit dem Coomassie-Farbstoff R-250.

Hierzu wurden die Titingele in einem Behälter mit Imperial Protein Stain vollständig bedeckt und für mindestens eine Stunde auf einem Universalschüttler gefärbt. Anschließend wurden die Gele so lange mit demineralisiertem Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich vom durchsichtigen Hintergrund zu trennen waren. Die gefärbten Titingele wurden anschließend mit dem Imager Fusion Fx von Vilber digitalisiert und die Proteinbanden mit dem Programm ImageJ nach der Pixeldichte quantifiziert.

### 2.2.2.3 Western Blot

Um weitere Proteinanalysen durchführen zu können, wurden die aufgetrennten Proteine eines SDS-Gels mithilfe des *semi-dry* Western blot Verfahrens elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen.

Hierzu wurden fünf in Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere auf die Anodenplatte gelegt. Darüber wurde die in Ethanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Auf die PVDF-Membran wurde das SDS-Gel so gebettet, dass keine Luftblasen entstehen. Schließlich wurden auf dem SDS-Gel fünf in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt. Nachdem die Blotting-Kassette mit der Kathodenplatte verschlossen wurde, wurde diese in die Blotting-Apparatur eingefügt. Der Proteintransfer erfolgte durch ein senkrecht zur Membran verlaufendes elektrisches Feld. Hierzu wurde für 10 % und 15 % Acrylamid-Trenngele bei einer Stromstärke von 2,5 Ampere (A) eine Spannung von 25 Volt (V) für 7 Minuten angelegt. Für den Transfer von Proteinen aus Titingelen wurde bei einer Stromstärke von 1,5 A eine Spannung von 20 V für 20 Minuten angelegt.

Um die Eignung der einzelnen PVDF-Membranen nach dem Blotten für weitere Versuche festzustellen, wurde der Proteintransfer auf die PVDF-Membran überprüft. Hierzu wurde die PVDF-Membran für zehn Sekunden in PVDF-STAIN gefärbt. Anschließend wurde die gefärbte PVDF-Membran so lange in PVDF-DESTAIN entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich vom weißen Hintergrund zu trennen waren. Schließlich wurde die PVDF-Membran zwei Mal für zehn Minuten mit TBST gewaschen.

Um die PVDF-Membran für die Immunfärbung vorzubereiten, wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran mit dem Blocker BSA gesättigt. Hierzu wurde die PVDF-Membran für mindestens eine Stunde in einem Behälter mit 2% BSA-TBST auf einem Universalschüttler gestellt.

### 2.2.2.4 Antikörpervermittelte Proteindetektion

Um die Phosphorylierungszustände der PEVK-Domäne und der PKC $\alpha$  sowie die Autophagie-Prozesse des Skelettmuskels zu analysieren, wurden die zuvor auf der PVDF-Membran transferierten Antigene mit Antikörper angefärbt.

Hierzu wurden die Antigene auf der PVDF-Membran für mindestens vier Stunden mit einem, in 2 % BSA verdünnten, primären Antikörper inkubiert (Tabelle 5). Anschließend wurde die PVDF-Membran vier Mal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Um die Position des Antigens sichtbar zu machen, folgte die mindestens zwei-stündige Inkubation mit einem an Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper (Tabelle 5). Dieser wurde ebenfalls in 2 % BSA verdünnt. Anschließend wurde die PVDF-Membran vier Mal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Um die Markierung des Antigens durch die primären und sekundären Antikörper zu quantifizieren, wurde mit der Westar-C-Ultra-Lösung eine Chemielumineszenz (ECL)-Reaktion ausgelöst. Die ECL-Reaktion wurde mit dem Imager Fusion Fx von Vilber digitalisiert und mit dem Programm ImageJ nach der Pixeldichte quantifiziert.

Um die Phosphorylierungszustände der PEVK-Domäne und der PKC $\alpha$  zu analysieren, wurden die Antigene auf der PVDF-Membran insgesamt zwei Mal mit Antikörper angefärbt. Die erste Immunfärbung erfolgte mit dem Phospho-Antikörper. Um eine erneute Immunfärbung zu ermöglichen, wurden die gebundenen Antikörper bei einem 35-minütigen Waschvorgang mit Mercaptoethanol haltigem *Stripping*-Puffer entfernt. Anschließend wurde die PVDF-Membran mindestens fünf Mal für zehn Minuten mit TBST gewaschen und erneut mit 2 % BSA blockiert. Die zweite Immunfärbung erfolgte mit dem *total*-Antikörper. Das Signal der ECL-Reaktion durch die Phospho-Antikörper wurde auf das Signal der *total*-Antikörper derselben Proteinbande normalisiert und die Phosphorylierungszustände somit als relative Phosphorylierung abgebildet.

### 2.2.3 Software

Zur Auswertung, statistischen Datenanalyse, Erstellung der Abbildungen und Diagramme sowie zur Verfassung der Texte wurden folgende Programme verwendet: Microsoft Word, Microsoft Excel,

MIE Medical MyoDat, Clarivate Analytics Endnote, Adobe Photoshop, CorelDraw Graphics Suite, National Institutes of Health ImageJ und Systat Sigma Plot.

### 2.2.4 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit der Software Systat Sigma Plot. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den relativen Phosphorylierungen und Verhältnissen wurde mit dem *one-way ANOVA* Test überprüft. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den calciumabhängigen Maximalkräften wurde mit dem *Student's t-test* überprüft. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den passiven Zugspannungen in Abhängigkeit der Faserdehnung wurde mit dem *two-way ANOVA* überprüft. Bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit ( $p$ ) von  $p < 0,05$  wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Diese wurde in den Abbildungen mit einem Stern markiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der Skelettmuskelfunktion bei Typ-2-Diabetes

##### 3.1.1 Abnahme der passiven Steifigkeit des Skelettmuskels bei Typ-2-Diabetes

Um den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die passive Steifigkeit des Skelettmuskels zu analysieren, wurde die passive Zugspannung von Muskelfaserbündel in Abhängigkeit der Faserdehnung gemessen. Nachdem die Ruhelänge der Muskelfaserbündel bestimmt und eingestellt wurde, wurden die Muskelfasern in fünf Schritten auf insgesamt 150 % der Ausgangslänge gedehnt und die dabei entstehende Zugspannung gemessen. Für die gesamte Messung wurden die Muskelfaserbündel in eine RS-Lösung überführt. Das exemplarische Messprotokoll eines Muskelfaserbündels ist in Abb. 8 dargestellt.

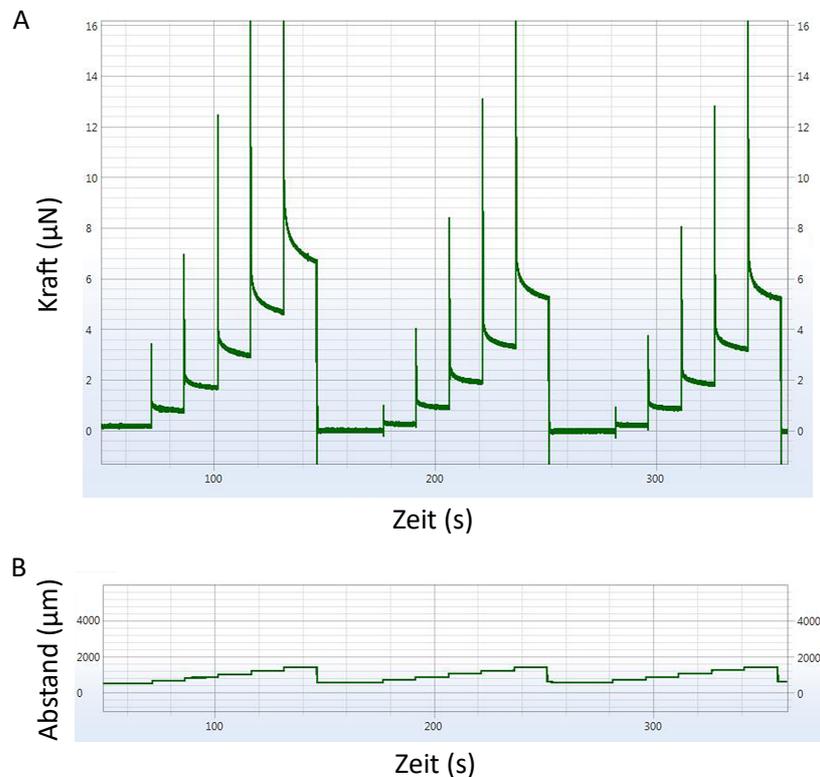


Abb. 8: Messprotokoll der passiven Zugspannung eines Skelettmuskelfaserbündels in Abhängigkeit der Faserdehnung. Ausgehend von der Ruhelänge wurde das eingespannte Muskelfaserbündel in fünf Schritten auf insgesamt 150 % gedehnt und zu seiner Ruhelänge zurückgebracht. Jedes Muskelfaserbündel wurde drei Mal hintereinander gedehnt. (A) Die Kraft in Mikronewton ( $\mu\text{N}$ ) wurde vom Kraftmesser, an welchem ein Ende des Muskelfaserbündels befestigt ist, gemessen. Die Kraft entspricht im Rahmen dieser Messung der passiven Zugspannung. Die Messung der Zeit in Sekunden (s) ermöglicht die Zuordnung der gemessenen Kraft zu einer bestimmten Faserdehnung. (B) Durch die Bewegung des Längengebers verändert sich der Abstand in Mikrometern ( $\mu\text{m}$ ) zwischen dem Längengeber und dem Kraftmesser. Die Vergrößerung des Abstands ermöglicht die Dehnung der Muskelfasern.

Die gemessene Zugspannung wurde auf die Querschnittsfläche der Muskelfaserbündel normalisiert. Dies ermöglicht den Vergleich von Messungen unterschiedlicher Muskelfaserbündel. Die passive Zugspannung von Muskelfaserbündel in Abhängigkeit der Faserdehnung wurde für das diabetische Rattenmodell ZSF1-*Obese* sowie für die Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* gemessen. Für jede Tiergruppe wurden Muskelproben aus fünf unterschiedlichen Tieren verwendet ( $n = 5$ ). Pro Tier wurden fünf Muskelfaserbündel präpariert. Jedes Muskelfaserbündel wurde drei Mal hintereinander gemessen.

Die passive Zugspannung in Abhängigkeit der Faserdehnung zeigte im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine statistisch signifikante Abnahme ( $p = 0,008$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* (Abb. 9).

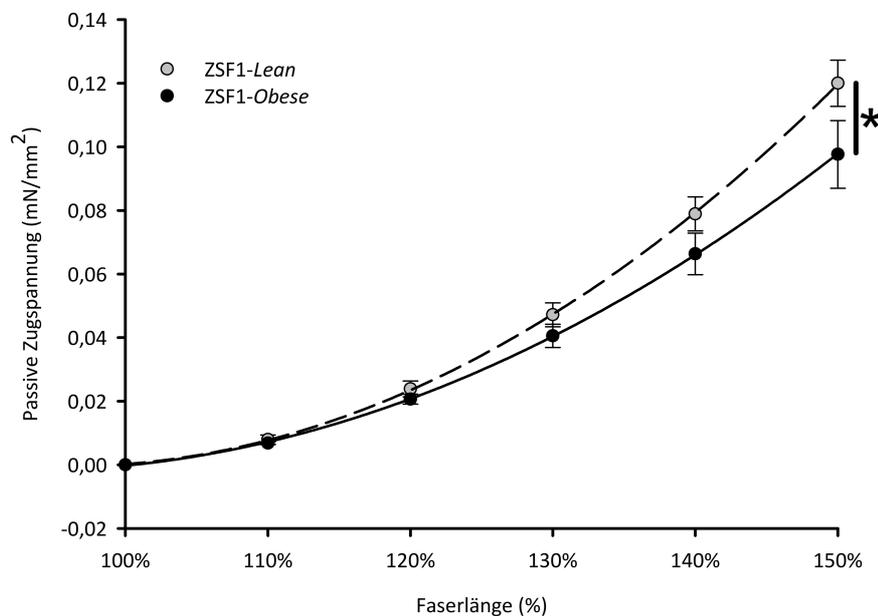


Abb. 9: **Abnahme der passiven Steifigkeit des Skelettmuskels M. Quadriceps bei Typ-2-Diabetes.** Die passive Zugspannung (mN/mm<sup>2</sup>) in Abhängigkeit der gedehnten Faserlänge in % wurde in Quadriceps-Muskelproben für das diabetische Rattenmodell ZSF1-*Obese* sowie die Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* gemessen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet.  $N = 5$  Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden fünf Muskelfaserbündel präpariert. Jedes Muskelfaserbündel wurde drei Mal gemessen. Für die Berechnung des Mittelwerts wurde jede Messung berücksichtigt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im two-way ANOVA).

### 3.1.2 Analyse der aktiven Kraft des Skelettmuskels bei Typ-2-Diabetes

Um den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die aktive Kraft des Skelettmuskels zu analysieren, wurde die calciumabhängige Maximalkraft gemessen. Diese Messung erfolgte direkt im Anschluss an die

## Ergebnisse

Messung der passiven Zugspannung. Nachdem die Ruhelänge des eingespannten Muskelfaserbündels kontrolliert und eventuell neu eingestellt wurde, wurde das Muskelfaserbündel für zehn Minuten in einer RS-Lösung ohne BDM für zehn Minuten relaxiert. Anschließend wurde mithilfe einer AS-Lösung eine Kontraktion der Muskelfasern ausgelöst und die calciumabhängige Maximalkraft gemessen. Das Messprotokoll einer Muskelfaser ist in Abb. 10 dargestellt.

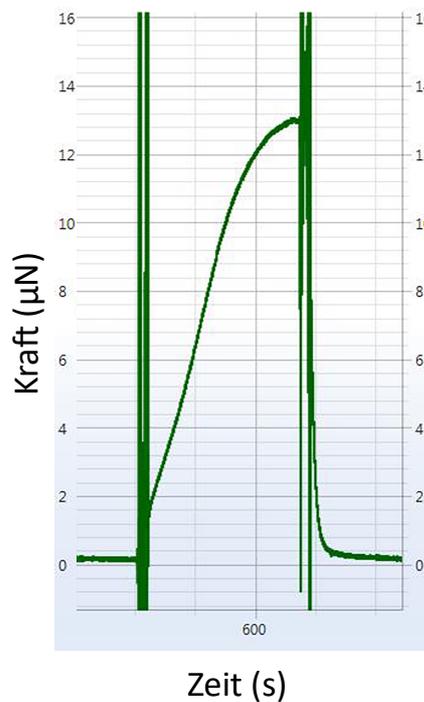


Abb. 10: **Messprotokoll der calciumabhängigen Maximalkraft eines Skelettmuskelfaserbündels.** Die Ruhelänge des eingespannten Muskelfaserbündels wurde während der gesamten Messung beibehalten (isometrische Kontraktion). Zu Beginn der Messung war das Muskelfaserbündel in einer RS-Lösung relaxiert. Die Kontraktion der Muskelfasern wurde durch die Überführung in eine calciumhaltige AS-Lösung ( $\text{pCa } 4,5$ ) ausgelöst. Sobald die gemessene Kraft ein Plateau erreichte, wurde das Muskelfaserbündel durch die Überführung in eine RS-Lösung für eine Minute relaxiert. Jedes Muskelfaserbündel wurde drei Mal hintereinander kontrahiert. Die durch die Kontraktion entstandene Kraft ( $\mu\text{N}$ ) wurde vom Kraftmesser, an welchem ein Ende der Muskelfaser befestigt ist, gemessen. Die Kraft entspricht im Rahmen dieser Messung der calciumabhängigen Maximalkraft. Die Position des Längengebers und somit auch der Abstand ( $\mu\text{m}$ ) zwischen dem Längengeber und dem Kraftmesser blieben während dieser Messung unverändert. Gleichzeitig erfolgte die Messung der Zeit (s), was unter anderem die Wiederholbarkeit der Messung ermöglicht.

Die gemessene calciumabhängige Maximalkraft wurde auf die Querschnittsfläche der Muskelfaserbündel normalisiert. Die calciumabhängige Maximalkraft von Muskelfaserbündel wurde für das diabetische Rattenmodell ZSF1-Obese sowie für die Kontrollgruppe ZSF1-Lean

gemessen. Für jede Tiergruppe wurden Muskelproben aus fünf unterschiedlichen Tieren verwendet ( $n = 5$ ). Pro Tier wurden fünf Muskelfaserbündel präpariert. Jedes Muskelfaserbündel wurde drei Mal hintereinander gemessen.

Die calciumabhängige Maximalkraft zeigte im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* ( $0,429 \pm 0,041 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  bei der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* und  $0,292 \pm 0,072 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  beim diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*) (Abb. 11).

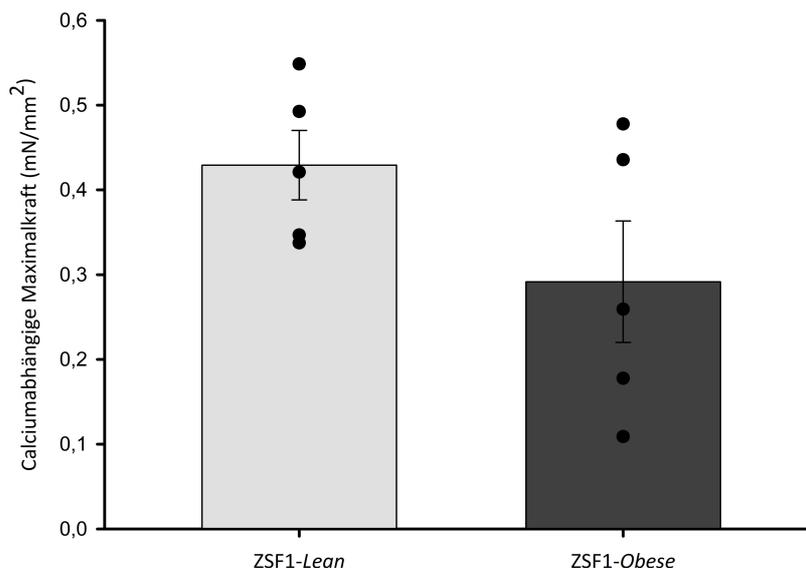


Abb. 11: **Analyse der calciumabhängigen Maximalkraft des Skelettmuskels M. Quadriceps bei Typ-2-Diabetes.** Die calciumabhängige Maximalkraft ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) wurde in Quadriceps-Muskelproben für das diabetische Rattenmodell ZSF1-*Obese* sowie die Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* gemessen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet.  $N = 5$  Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden fünf Muskelfaserbündel präpariert. Jedes Muskelfaserbündel wurde drei Mal gemessen. Für die Berechnung des Mittelwerts wurde jede Messung berücksichtigt. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere sind in der Graphik jeweils durch einen Punkt dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im *Student's t-Test*).

### 3.2 Analyse des Sarkomerproteins Titin bei Typ-2-Diabetes

Um den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin im Skelettmuskel zu analysieren, wurden die Phosphorylierung der PEVK-Domäne in der elastischen I-Band Region, die Aktivität der PKC $\alpha$  sowie das Titin T2/T1 Verhältnis biochemisch analysiert.

### 3.2.1 Zunahme der PEVK-Phosphorylierung bei Typ-2-Diabetes

Die Phosphorylierung der PEVK-Domäne in der elastischen I-Band Region wurde immunhistochemisch analysiert. Zur Proteinauftrennung wurden agarosestabilisierte Titingele mit einem Acrylamidanteil von 2,1 % verwendet. Anschließend wurden die Proteine mithilfe des *semi-dry* Westernblots elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Schließlich konnten durch Immunfärbung an Antigen gebundene Antikörper durch eine ECL-Reaktion sichtbar gemacht werden. Die ECL-Reaktion konnte mit einem Imager quantifiziert werden. Es wurden phosphospezifische Antikörper verwendet, die in der PEVK-Domäne an den phosphorylierten Serinresten S11878 und S12022 binden. Als *total*-Antikörper wurde der PEVK *total* SY4638 verwendet, der phosphorylierungsunabhängig in dieser Region bindet. Das Signal der ECL-Reaktion durch die PEVK phospho-Antikörper wurde auf das Signal der PEVK *total*-Antikörper normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf die Wistar-Kontrollgruppe normiert. Die Phosphorylierung der PEVK-Domäne wurde im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*, in der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* sowie in der Wistar-Kontrollgruppe analysiert. Pro Tiergruppe wurden Muskelproben aus vier bis sechs unterschiedlichen Tieren verwendet (n = 4-6). Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Skelettmuskelpräparationen ausgewertet.

Die PEVK-Phosphorylierung an der Bindungsstelle S11878 zeigte im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine statistisch signifikante Zunahme ( $p = 0,019$ ) um  $35,7 \pm 9,0$  % im Vergleich zur Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* (Abb. 12). Auch im Vergleich zur Wistar-Kontrollgruppe zeigte sich im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine statistisch signifikante Zunahme ( $p < 0,001$ ) der PEVK-Phosphorylierung an S11878 um  $83,8 \pm 9,0$  % (Abb. 12). Außerdem zeigte die PEVK-Phosphorylierung an S11878 in der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* eine statistisch signifikante Zunahme ( $p = 0,006$ ) um  $48,0 \pm 12,8$  % im Vergleich zur Wistar-Kontrollgruppe (Abb. 12).

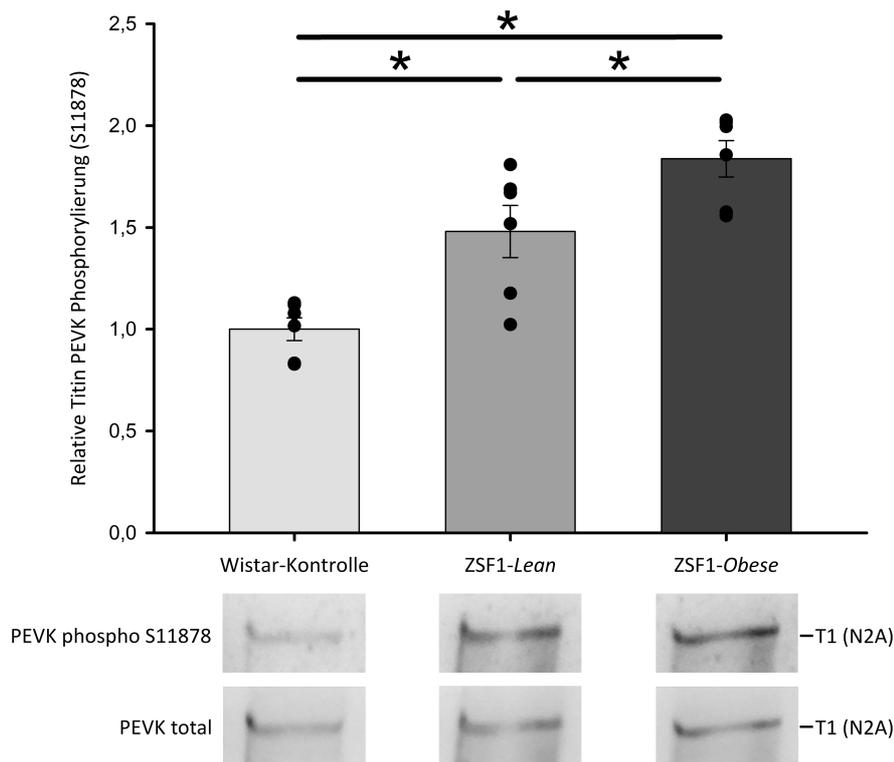


Abb. 12: **Zunahme der PEVK-Phosphorylierung an der Bindungsstelle S11878 bei Typ-2-Diabetes.** Repräsentative Blots sind unter den jeweiligen Balken abgebildet. Phospho-Signale wurden auf den *total*-Signalen normalisiert und anschließend auf die Wistar-Kontrolle normiert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet. N = 4-6 Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Quadriceps-Skelettmuskelpräparationen ausgewertet und deren Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere sind in der Graphik jeweils durch einen Punkt dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im *one-way ANOVA*).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* sowie zur Wistar-Kontrollgruppe blieb die relative PEVK-Phosphorylierung an der Bindungsstelle S12022 im ZSF1-*Obese* Rattenmodell unverändert ( $100,0 \pm 8,6$  % bei der Wistar-Kontrollgruppe,  $101,3 \pm 12,9$  % bei der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* und  $107,0 \pm 12,1$  % im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*) (Abb. 13).

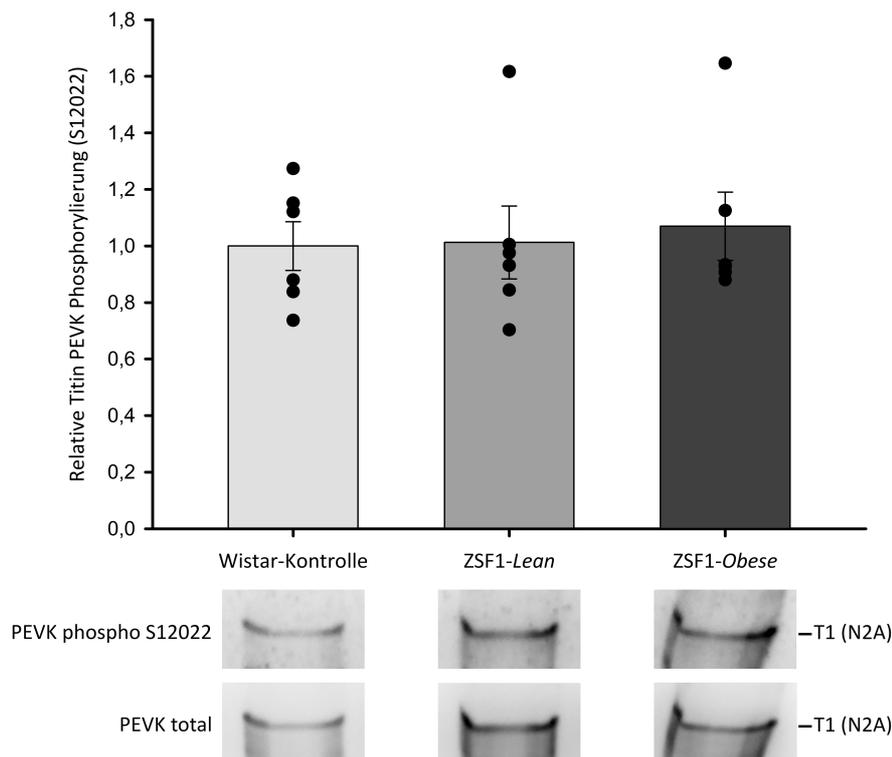


Abb. 13: **Analyse der PEVK-Phosphorylierung an der Bindungsstelle S12022 bei Typ-2-Diabetes.** Repräsentative Blots sind unter den jeweiligen Balken abgebildet. Phospho-Signale wurden auf den *total*-Signalen normalisiert und anschließend auf die Wistar-Kontrolle normiert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet. N = 4-6 Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Quadriceps-Skelettmuskelpräparationen ausgewertet und deren Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere sind in der Graphik jeweils durch einen Punkt dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im *one-way ANOVA*).

### 3.2.2 Tendenzuell verminderte Aktivität der PKC $\alpha$ bei Typ-2-Diabetes

Die Aktivität der PKC $\alpha$  wurde durch die immunohistochemische Analyse der Phosphorylierung von PKC $\alpha$  an der Stelle T497 untersucht. Die Proteinauftrennung erfolgte nach dem Lämmli-System mithilfe von Trenngelen mit einem Acrylamidanteil von 10 %. Anschließend wurden die Proteine mithilfe des *semi-dry* Westernblots elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Schließlich konnten durch Immunfärbung an Antigen gebundene Antikörper durch eine ECL-Reaktion sichtbar gemacht werden. Die ECL-Reaktion konnte mit einem Imager quantifiziert werden. Es wurden phospho-spezifische Antikörper verwendet, die in der PKC $\alpha$  an der Phosphorylierungsstelle T497 binden. Als *total*-Antikörper wurde der PKC $\alpha$  *total* verwendet, der phosphorylierungsunabhängig in dieser Region bindet. Das Signal der ECL-Reaktion durch die PKC $\alpha$  phospho-Antikörper wurde auf das Signal der PKC $\alpha$  *total*-Antikörper normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf die Wistar-Kontrollgruppe normiert. Die Aktivität der PKC $\alpha$  wurde im

## Ergebnisse

diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*, in der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* sowie in der Wistar-Kontrollgruppe analysiert. Pro Tiergruppe wurden Muskelproben aus vier bis sechs unterschiedlichen Tieren verwendet ( $n = 4-6$ ). Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Skelettmuskelpräparationen ausgewertet.

Die relative PKC $\alpha$ -Phosphorylierung an der Bindungsstelle T497 zeigte im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine tendenzielle Abnahme ( $p = 0,073$ ) um  $17,6 \pm 5,2$  % im Vergleich zur Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* (Abb. 14). Im Vergleich zur Wistar-Kontrollgruppe blieb die relative Phosphorylierung der PKC $\alpha$  sowohl im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* als auch bei der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* unverändert ( $100,0 \pm 6,6$  % bei der Wistar-Kontrollgruppe,  $101,1 \pm 4,9$  % bei der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* und  $83,5 \pm 5,2$  % im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*) (Abb. 14).

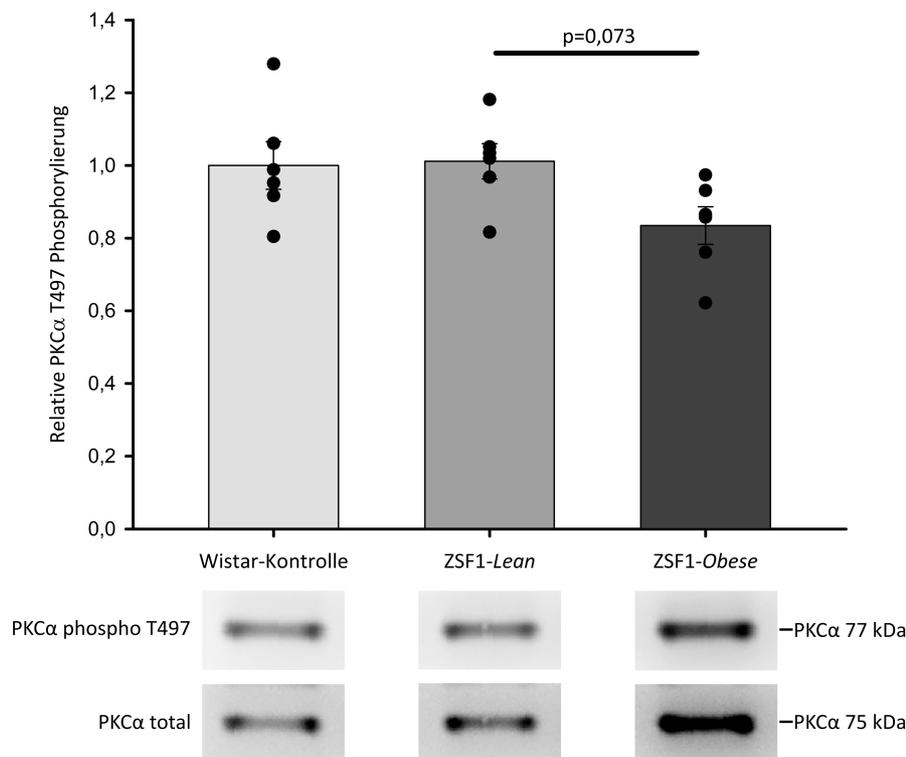


Abb. 14: **Tendenzielle Abnahme der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung an der Bindungsstelle T497 bei Typ-2-Diabetes.**

Repräsentative Blots sind unter den jeweiligen Balken abgebildet. Phospho-Signale wurden nach den *total*-Signalen normalisiert und anschließend auf die Wistar-Kontrolle normiert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet.  $N = 4-6$  Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Quadriceps-Skelettmuskelpräparationen ausgewertet und deren Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere sind in der Graphik jeweils durch einen Punkt dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im *one-way ANOVA*).

### 3.2.3 Analyse des T2/T1 Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes

Titin 2 (T2) ist ein Degradationsprodukt von Titin (T1), und wurde zum ersten Mal in 1979 beschrieben (Wang et al., 1979). Ein erhöhtes T2/T1 Verhältnis zeigt eine verstärkte Degradation des Skelettmuskels an. Das Titin T2/T1 Verhältnis wurde durch die Coomassie-Färbung von Titingelen mit einem Acrylamidanteil von 2,1 % analysiert. Die T2-Proteinbande befand sich nach der Proteinauftrennung durch die SDS-PAGE unmittelbar unterhalb der T1-Bande. Die Färbung der Proteinbanden konnte mit einem Imager quantifiziert werden. Das T2-Signal wurde auf das T1-Signal normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf die Wistar-Kontrollgruppe normiert. Das Titin T2/T1 Verhältnis wurde im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*, in der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* sowie in der Wistar-Kontrollgruppe analysiert. Pro Tiergruppe wurden Muskelproben aus vier bis sechs unterschiedlichen Tieren verwendet (n = 4-6). Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Skelettmuskelpräparationen ausgewertet.

Das relative T2/T1 Verhältnis im ZSF1-*Obese* Rattenmodell und in der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* zeigte sich im Vergleich zur Wistar-Kontrollgruppe mit einem p-Wert von  $p = 0,267$  tendenziell vermindert ( $100,0 \pm 4,0$  % bei der Wistar-Kontrollgruppe,  $84,0 \pm 8,9$  % bei der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* und  $83,5 \pm 8,2$  % im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*) (Abb. 15).

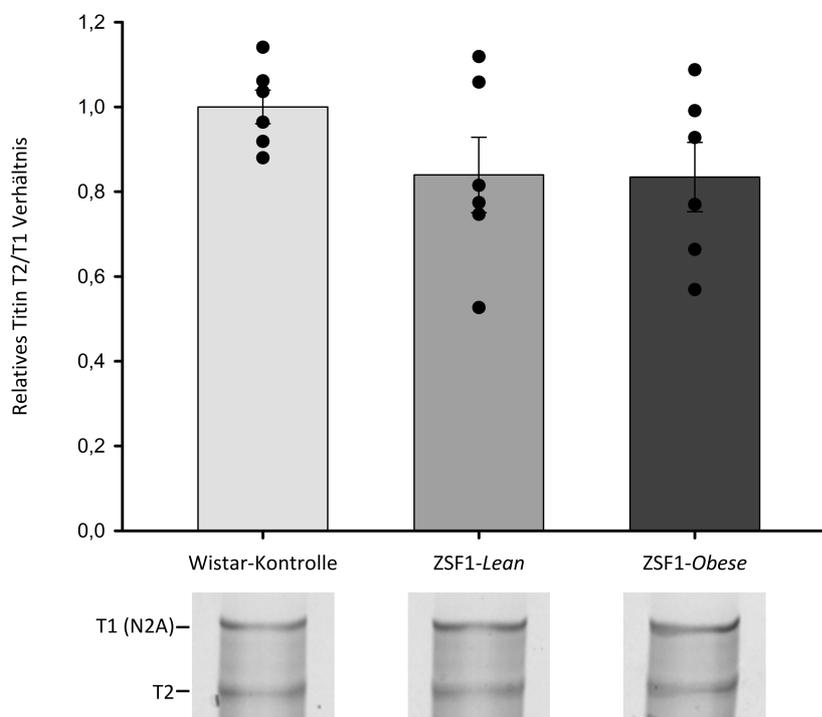


Abb. 15: **Analyse des T2/T1 Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes.** Repräsentative Titingele sind unter den jeweiligen Balken abgebildet. T2-Signale wurden auf den T1-Signalen normalisiert und anschließend auf die Wistar-Kontrolle normiert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet. N = 4-6 Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Quadriceps-

Skelettmuskelpräparationen ausgewertet und deren Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere sind in der Graphik jeweils durch einen Punkt dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im *one-way ANOVA*).

### 3.3 Analyse der Autophagie-Prozesse im Skelettmuskel bei Typ-2-Diabetes

Um den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die Autophagie-Prozesse im Skelettmuskel zu analysieren, wurden die Autophagiemarker LC3B sowie SQSTM1/p62 biochemisch analysiert. Während der Autophagie-Prozesse wird LC3-I zu LC3-II konvertiert sowie p62 abgebaut (Kabeya et al., 2000; Bjørkøy et al., 2005). Zusätzlich korreliert die Menge an LC3-II mit der Bildung von Autophagosomen (Kabeya et al., 2000). Bei einer Inhibition der Autophagie-Prozesse im Skelettmuskel wäre somit sowohl mit einer Senkung des LC3B II/I Verhältnisses als auch mit einer Akkumulation von p62 zu rechnen (Mizushima und Hara, 2006; Pankiv et al., 2007; Klionsky et al., 2008). Das UPS sowie diverse Erkrankungen beeinflussen jedoch auch p62, sodass dieser Marker nicht allein, sondern im Zusammenhang mit LC3-II Veränderungen interpretiert werden sollte (Mizushima und Yoshimori, 2007; Bardag-Gorce et al., 2005; Kuusisto et al., 2001; Nakaso et al., 2004).

#### 3.3.1 Senkung des LC3B II/I Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes

Das LC3B II/I Verhältnis wurde biochemisch analysiert. Die Proteinauftrennung erfolgte nach dem Lämmli-System mithilfe von Trenngelen mit einem Acrylamidanteil von 15 %. Anschließend wurden die Proteine mithilfe des *semi-dry* Westernblots elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Schließlich konnten durch Immunfärbung an Antigen gebundene Antikörper durch eine ECL-Reaktion sichtbar gemacht werden. Auch wenn LC3B II (sichtbar auf der Höhe von 14 kDa) durch die Konjugation mit PE das höhere Molekulargewicht besitzt, wandert es wegen seiner erhöhten Hydrophobie während der SDS-PAGE weiter als das LC3B I (sichtbar auf der Höhe von 16 kDa) (Mizushima und Yoshimori, 2007). Das LC3B II-Signal der ECL-Reaktion wurde auf das LC3B I-Signal normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf die Wistar-Kontrollgruppe normiert. Das LC3B II/I Verhältnis wurde im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese*, in der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* sowie in der Wistar-Kontrollgruppe analysiert. Pro Tiergruppe wurden Muskelproben aus vier bis sechs unterschiedlichen Tieren verwendet ( $n = 4-6$ ). Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Skelettmuskelpräparationen ausgewertet.

Das relative LC3B II/I Verhältnis zeigte im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine statistisch signifikante Abnahme ( $p = 0,050$ ) um  $14,1 \pm 2,7$  % im Vergleich zur Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* (Abb. 16). Auch im Vergleich zur Wistar-Kontrollgruppe zeigte sich im diabetischen Rattenmodell ZSF1-

*Obese* eine statistisch signifikante Abnahme ( $p < 0,001$ ) des relativen LC3B II/I Verhältnisses um  $54,0 \pm 2,7\%$  (Abb. 16). Außerdem zeigte das relative LC3B II/I Verhältnis in der Kontrollgruppe ZSF1-*Lean* eine statistisch signifikante Abnahme ( $p < 0,001$ ) um  $40,0 \pm 3,9\%$  im Vergleich zur Wistar-Kontrollgruppe (Abb. 16).

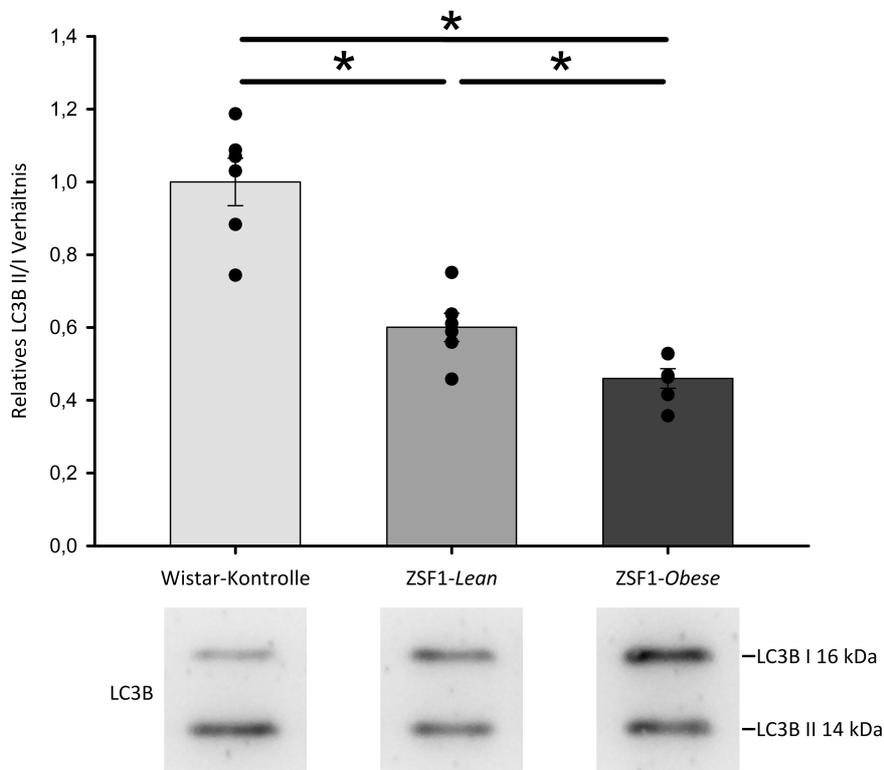


Abb. 16: **Senkung des LC3B II/I Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes.** Repräsentative Blots sind unter den jeweiligen Balken abgebildet. LC3B II-Signale wurden auf den LC3B I-Signalen normalisiert und anschließend auf die Wistar-Kontrolle normiert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet.  $N = 4-6$  Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Quadriceps-Skelettmuskelpreparationen ausgewertet und deren Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere sind in der Graphik jeweils durch einen Punkt dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im *one-way ANOVA*).

### 3.3.2 Analyse des p62/GAPDH Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes

Die Autophagie-Prozesse wurden auch durch die Bestimmung des relativen p62/GAPDH Verhältnisses analysiert. Das p62/GAPDH Verhältnis wurde mittels Western blot Verfahren bestimmt. Die Proteinauftrennung erfolgte nach dem Lämmli-System mithilfe von Trenngelen mit einem Acrylamidanteil von 15 %. Das SQSTM1/p62-Signal (62 kDa) der ECL-Reaktion wurde auf das GAPDH-Signal (37 kDa) normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse auf die Wistar-Kontrollgruppe normiert. Das p62/GAPDH Verhältnis wurde im diabetischen Rattenmodell ZSF1-

## Ergebnisse

*Obese*, in der Kontrollgruppe *ZSF1-Lean* sowie in der Wistar-Kontrollgruppe analysiert. Pro Tiergruppe wurden Muskelproben aus vier bis sechs unterschiedlichen Tieren verwendet ( $n = 4-6$ ). Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Skelettmuskelpräparationen ausgewertet.

Das relative p62/GAPDH Verhältnis im *ZSF1-Obese* Rattenmodell blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe *ZSF1-Lean* sowie zur Wistar-Kontrollgruppe unverändert ( $100,0 \pm 12,0$  % bei der Wistar-Kontrollgruppe,  $113,9 \pm 10,2$  % bei der Kontrollgruppe *ZSF1-Lean* und  $98,3 \pm 15,6$  % im diabetischen Rattenmodell *ZSF1-Obese*) (Abb. 17).

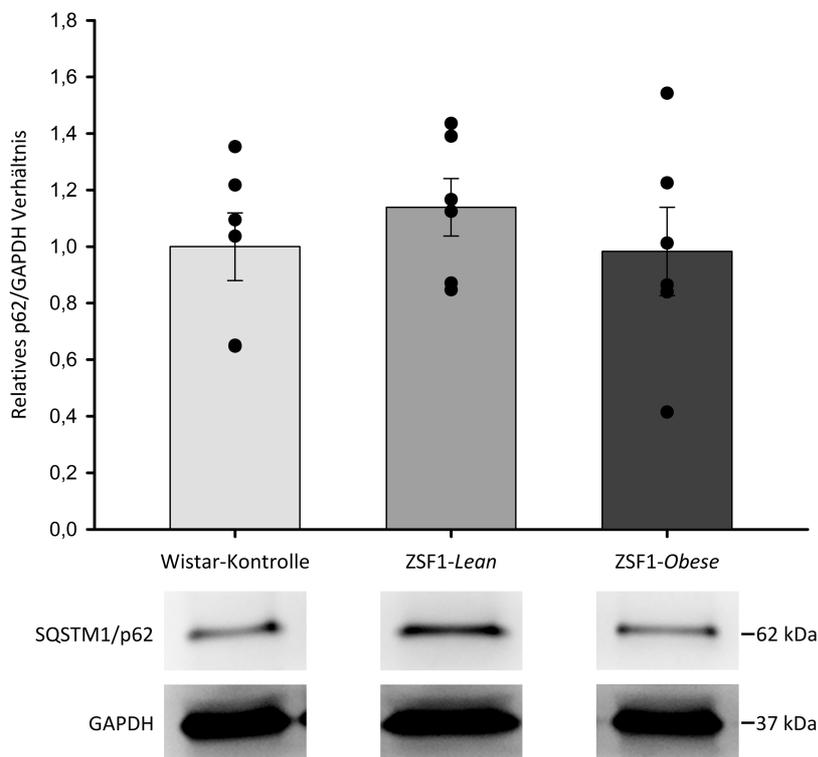


Abb. 17: **Analyse des p62/GAPDH Verhältnisses bei Typ-2-Diabetes.** Repräsentative Blots (2.4) sind unter den jeweiligen Balken abgebildet. SQSTM1/p62-Signale wurden nach den GAPDH-Signalen normalisiert und anschließend auf die Wistar-Kontrolle normiert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler abgebildet.  $N = 4-6$  Tiere pro Tiergruppe. Pro Tier wurden drei unterschiedliche Proteinbanden aus unterschiedlichen Quadriceps-Skelettmuskelpräparationen ausgewertet und deren Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Tiere sind in der Graphik jeweils durch einen Punkt dargestellt. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern gekennzeichnet ( $p < 0,05$  im *one-way ANOVA*).

### 4. Diskussion

Die physiologische Skelettmuskelfunktion setzt eine physiologische Dehnbarkeit sowie eine physiologische aktive Kraftentwicklung der Muskelzellen voraus. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass durch Übergewicht und einem Mangel an körperlicher Aktivität ein Energieüberschuss in den Skelettmuskelzellen entsteht, der zu einer Insulinresistenz und bei gestörter  $\beta$ -Zellfunktion zum Typ-2-Diabetes führen kann (Kahn et al., 2005; Szoke und Gerich, 2005; Ye, 2013). Auf der anderen Seite leiden Patienten mit Typ-2-Diabetes häufiger, schneller und exzessiver an einem Verlust der Muskelmasse und -Funktion (Hirata et al., 2019; Kalyani et al., 2014; Park et al., 2009; Park et al., 2007). Dabei soll die Insulinresistenz das Muskelwachstum hemmen, da Insulin die Proteinsynthese sowie das Zellwachstum verstärkt (James et al., 2017; Luo et al., 2006). Die hier vorgestellte Arbeit untersuchte den Einfluss des Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin und seine Beteiligung an einer gestörten Skelettmuskelfunktion. Hierzu wurden die passive Steifigkeit und die aktive Kraftentwicklung von Muskelfaserbündel analysiert und post-translationale Modifikationen von Titin bestimmt. Zudem erfolgte eine Analyse der Titindegredation sowie zentraler Autophagie-Prozesse. Darüber hinaus wurden die neuen Erkenntnisse zur Auswirkung des Typ-2-Diabetes auf die Skelettmuskelfunktion und das Sarkomerprotein Titin mit Daten aus Studien zu Herzmuskelzellen verglichen und mit der chronischen Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht.

#### 4.1 Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf die Skelettmuskelfunktion

Durch die Messung der passiven Zugspannung in Abhängigkeit der Faserdehnung konnte gezeigt werden, dass der Typ-2-Diabetes im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zu einer statistisch signifikanten Senkung der passiven Steifigkeit von Quadriceps-Muskelfaserbündel führt. Eine weitere Studie hat gezeigt, dass der Typ-2-Diabetes in humanen Muskelfasern zu einer erhöhten passiven Steifigkeit führt (Lee et al., 2020). Die verschiedenen Methoden, die gewebedingt für die Messung der passiven Steifigkeit verwendet wurden, könnten ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Die Muskelproben für die Messung der passiven Steifigkeit wurden zwar in beiden Arbeiten mit einer Triton-Lösung permeabilisiert, jedoch wurden in der hier vorliegenden Arbeit ganze Skelettmuskelfaserbündel verwendet, während in der Studie von Lee et al. einzelne Skelettmuskelfasern präpariert wurden (Lee et al., 2020). Eine weitere Möglichkeit für die verschiedenen Ergebnisse könnte darin liegen, dass die passive Steifigkeit des Skelettmuskels sowohl von der Titin-basierten Myofilamentsteifigkeit als auch unter anderem von der extrazellulären Matrix vorgegeben wird (Wang et al., 1993). Somit könnte es auch sein, dass die Ergebnisse aus den verschiedenen Methoden unterschiedlich stark von der extrazellulären Matrix beeinflusst wurden. Vorherige Arbeiten haben nicht nur gezeigt, dass die extrazelluläre Matrix bei

Typ-2 Diabetes verändert ist, sondern auch, dass der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die passive Steifigkeit bei Typ-2 Diabetes höher ist als bei gesunden Patienten (Lee et al., 2020; Berria et al., 2006). Auf der anderen Seite legten Brynnel et al. nahe, dass Titin den größten Anteil zur passiven Steifigkeit in der physiologischen Skelettmuskulatur beiträgt (Brynnel et al., 2018).

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Arbeiten ist unklar, ob die verminderte passive Steifigkeit in Quadriceps-Muskelfaserbündel des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* auch für einzelne Muskelfasern oder für die gesamte Muskulatur geltend gemacht werden darf. Des Weiteren kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilt werden, ob es im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zu einer Reduzierung der passiven Steifigkeit durch Titin selbst oder durch die Extrazelluläre Matrix kommt.

Durch die Messung der calciumabhängigen Maximalkraft von Quadriceps-Muskelfaserbündeln konnte gezeigt werden, dass der Typ-2-Diabetes im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zu einer tendenziellen Senkung der aktiven Kraftentwicklung führt. Zudem zeigte sich auch die Varianz der calciumabhängigen Maximalkraft beim ZSF1-*Obese* Rattenmodell größer als in der Kontrollgruppe. Auch vorherige Studien zeigten mit ihren Daten bereits vergleichbare Ergebnisse. Rodriguez-Reyes et al. stellten fest, dass ein Streptozotocin induzierter Diabetes in Soleus-Muskelproben von Ratten zu einer tendenziell verminderten aktiven Kraftentwicklung führt (Rodríguez-Reyes et al., 2016). Eine weitere Studie zeigte, dass der Typ-2-Diabetes in humanen Gluteus-Muskelfasern ebenfalls eine tendenziell verminderte aktive Kraftentwicklung verursacht (Lee et al., 2020). Zudem demonstrierten Schauer et al. in einer Arbeit, dass es unter anderem in Soleus-Muskelfaserbündeln von 32 Wochen alten ZSF1-*Obese* Ratten auch zu einer verminderten aktiven Kraftentwicklung kam (Schauer et al., 2020). Diese Ergebnisse konnten bereits in mehreren klinischen Studien bestätigt werden, in welchen eine verminderte Maximalkraft von verschiedenen Muskelgruppen bei, an Typ-2-Diabetes erkrankten Patienten festgestellt wurden (Andersen et al., 2004; Kalyani et al., 2015; Park et al., 2006).

Somit weisen die hier vorliegenden Daten daraufhin, dass der Typ-2-Diabetes im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* wie in anderen Tiermodellen und in klinischen Studien an Patienten zu einer verminderten aktiven Kraftentwicklung in der Skelettmuskulatur führen kann.

In vorherigen Arbeiten wurde bereits kontrovers diskutiert, welchen Einfluss eine verminderte oder gesteigerte passive Steifigkeit auf die aktive Kraftentwicklung hat (Linke, 2018). Vor allem in der Herzmuskulatur soll eine verminderte passive Steifigkeit einen positiven Effekt auf die diastolische Ventrikelfüllung haben (Krüger und Linke, 2009; Linke und Krüger, 2010). Ob sich eine verminderte passive Steifigkeit in der Skelettmuskulatur auch positiv auf die aktive Kraftentwicklung auswirkt,

ist aufgrund der aktuellen Studienlage nicht abschließend beurteilbar (Linke, 2018). Jedoch zeigten Lee et al., dass der Typ-2-Diabetes in humanen Gluteus-Muskelfasern eine tendenziell verminderte aktive Kraftentwicklung bei gesteigerter passiver Steifigkeit zur Folge hat (Lee et al., 2020). Interessanterweise zeigte sich im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* trotz reduzierter passiver Steifigkeit ebenso eine tendenziell verminderte aktive Kraftentwicklung. Neben der Möglichkeit, dass sich die reduzierte passive Steifigkeit hier direkt negativ auf die aktive Kraftentwicklung auswirkt, wäre es auch möglich, dass ein anderer Mechanismus für die tendenziell verminderte aktive Kraftentwicklung verantwortlich ist. In vorherigen Studien konnten Veränderungen der Calcium-Sensitivität bei verschiedenen diabetischen Tiermodellen festgestellt werden (Howarth und Qureshi, 2008; Howarth et al., 2011; Greenman et al., 2021; Ng et al., 2022). Des Weiteren zeigten Erickson et al., dass es bei einer Hyperglykämie durch Diabetes zu einer verstärkten CaMKII $\delta$ -abhängigen Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum kommt (Erickson et al., 2013). Eine Studie zeigte auch, dass sich Titin in der Skelettmuskulatur calciumabhängig an Aktin bindet und, dass diese Bindung die passive Steifigkeit erhöhen kann (Dutta et al., 2018). Auch wenn in dieser Arbeit die Calcium-Sensitivität, ihr Einfluss auf die passive Steifigkeit und die aktive Kraftentwicklung sowie weitere Calcium-abhängige Signalwege nicht direkt untersucht wurden scheint es klar zu sein, dass diese die passive Steifigkeit und aktive Kraftentwicklung im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* beeinflussen. Ein weiterer Hinweis für eine Störung der Calcium-Sensitivität und der Calcium-abhängigen Signalwege bei Typ-2-Diabetes könnte sein, dass sich in dieser Arbeit die Varianz der calciumabhängigen Maximalkraft im ZSF1-*Obese* Rattenmodell größer als in der Kontrollgruppe zeigte.

Neben der Möglichkeit, dass sich die reduzierte passive Steifigkeit hier direkt negativ auf die aktive Kraftentwicklung auswirkt, könnte eine Störung der Calcium-Sensitivität und der Calcium-abhängigen Signalwege somit eine Erklärung sein, warum es bei reduzierter passiver Steifigkeit im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zu einer tendenziell verminderten aktiven Kraftentwicklung kommt.

Zusammenfassend führt der Typ-2-Diabetes in Quadriceps-Muskelfaserbündel des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* zu einer reduzierten passiven Steifigkeit und einer tendenziell verminderten aktiven Kraftentwicklung. Aufgrund der aktuellen Studienlage kann derzeit noch nicht beurteilt werden, ob Titin selbst oder die Extrazelluläre Matrix eine Reduzierung der passiven Steifigkeit im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* verursacht. Dass die aktive Kraftentwicklung in der Skelettmuskulatur bei Typ-2-Diabetes tendenziell vermindert ist, wurde bereits in anderen Tiermodellen und in klinischen Studien an Patienten untersucht und wird von den hier vorliegenden Daten unterstützt. Dass bei reduzierter passiver Steifigkeit eine tendenziell verminderte aktive

Kraftentwicklung vorliegt, könnte, neben der Möglichkeit, dass sich die reduzierte passive Steifigkeit direkt negativ auf die aktive Kraftentwicklung auswirkt, durch eine Störung der Calcium-Sensitivität und der Calcium-abhängigen Signalwege erklärt werden. Um die Ursachen der reduzierten passiven Steifigkeit und der tendenziell verminderten Kraftentwicklung im diabetischen Rattenmodell *ZSF1-Obese* besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit zusätzlich post-translationale Modifikationen von Titin bestimmt und die Titin-Degradation sowie zentrale Autophagie-Prozesse analysiert.

### 4.2 Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin in der Skelettmuskulatur vor allem auf die post-translationalen Modifikationen von Titin untersucht. Die Auswirkung von Diabetes und Insulin auf das Sarkomerprotein Titin wurde bis jetzt hauptsächlich im Herzmuskel untersucht.

So konnte in vorherigen Arbeiten bereits gezeigt werden, dass Insulin in Kardiomyozyten über den PI3K/Akt Signalweg den Anteil der kleineren Titin N2B-Isoform erhöht und, dass in Patienten mit Typ-2-Diabetes der funktionelle Insulinmangel zu einem größeren Anteil der längeren Titin N2BA-Isoform führt (Krüger et al., 2010; Hopf et al., 2018). Durch eine Änderung des Titin Isoform-Verhältnisses und somit der Größe von Titin, kann die Steifigkeit des Sarkomers über einen längeren Zeitraum angepasst werden (Freiburg et al., 2000). In dieser Arbeit konnte beim diabetischen Rattenmodell *ZSF1-Obese* keine Änderung des Molekulargewichts von N2A festgestellt werden. Somit kann eine Änderung der Größe von Titin nicht für die reduzierte passive Steifigkeit im diabetischen Rattenmodell *ZSF1-Obese* verantwortlich sein.

Da im Sarkomer die Steifigkeit auch schnell und dynamisch durch die post-translationale Phosphorylierung der elastischen Titin-Domäne PEVK geändert werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung von PEVK an S11878 und S12022 biochemisch analysiert (Kötter et al., 2014a). Hier zeigte sich im diabetischen Rattenmodell *ZSF1-Obese* eine statistisch signifikante Erhöhung der relativen Phosphorylierung von PEVK an S11878, wohingegen die Phosphorylierung an S12022 unverändert blieb. Da die PEVK-Domäne an S11878 und S12022 von der PKC $\alpha$  phosphoryliert werden kann, wurde die Aktivität von PKC $\alpha$  durch die Analyse ihrer Phosphorylierung untersucht (Hidalgo et al., 2009). Die Phosphorylierung und somit die Aktivität der PKC $\alpha$  zeigte sich interessanterweise tendenziell vermindert, sodass für die erhöhte Phosphorylierung an S11878 und unveränderte Phosphorylierung an S12022 ein anderer Mechanismus verantwortlich sein muss, der möglicherweise vom Glukose- und Insulinstoffwechsel

beeinflusst wird. Neben der PKC $\alpha$  wurde auch für die CaMKII $\delta$  eine Phosphorylierung von Titin in der PEVK-Region beschrieben (Hamdani et al., 2013b; Hidalgo et al., 2013). Zudem wurde CaMKII $\delta$  bei einer Hyperglykämie, wie sie beim Typ-2-Diabetes vorkommt, bereits eine gesteigerte Aktivität zugesprochen (Erickson et al., 2013). Somit könnte die erhöhte Phosphorylierung von PEVK an S11878 und die unveränderte Phosphorylierung an S12022, trotz verminderter PKC $\alpha$ -Aktivität durch eine gesteigerte Aktivität der CaMKII $\delta$  vermittelt sein, die hier leider nicht untersucht werden konnte (Abb. 18). Interessanterweise zeigte sich auch im ZSF1-*Lean* Rattenmodell eine statistisch signifikant erhöhte Phosphorylierung von PEVK an S11878. Der noch unbekannte Mechanismus, der in den Rattenmodellen ZSF1-*Lean* und ZSF1-*Obese* zur Hyperphosphorylierung von S11878 und unveränderten Phosphorylierung von S12022 führt, könnte somit in beiden ZSF1 Rattenmodellen von genetischen Faktoren beeinflusst und zusätzlich durch die Diät-induzierte Glukoseintoleranz im ZSF1-*Obese* Rattenmodell verstärkt werden.

Andere Arbeiten haben gezeigt, dass in der Herzmuskulatur eine erhöhte post-translationale Phosphorylierung von Titin in der PEVK-Domäne zu einer Verkürzung der Persistenzlänge dieser Domäne und einer erhöhten passiven Steifigkeit des Titinmoleküls und des Sarkomers führt (Hidalgo et al., 2009). Diese Daten konnten in dieser Arbeit für die Skelettmuskulatur nicht bestätigt werden, da sich die passive Steifigkeit in der Skelettmuskulatur des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* trotz erhöhter Phosphorylierung von PEVK an S11878 reduziert zeigte. Brynne et al. belegten, dass das Titin die passive Steifigkeit dominierend beeinflusst, sodass keine anderweitige Struktur im Sarkomer die reduzierte passive Steifigkeit im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* allein erklären kann (Brynne et al., 2018). Vielmehr könnte für die erniedrigte passive Steifigkeit in der Skelettmuskulatur des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* eine bisher noch nicht identifizierte posttranslationale Modifikation von Titin verantwortlich sein, dessen Nachweis das Thema zukünftiger Arbeiten sein wird (Abb. 18). Eine Möglichkeit wäre, dass die passive Steifigkeit beim Typ-2-Diabetes von oxidativem Stress beeinflusst wird. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass durch oxidativer Stress die Bildung von Disulfidbrückenbindungen in der N2Bus die passive Steifigkeit in Kardiomyozyten erhöht während eine reversible S-Glutathionylierung die passive Steifigkeit sowohl in Kardiomyozyten als auch in der Skelettmuskulatur reduziert (Beckendorf und Linke, 2015). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die passive Steifigkeit von einer posttranslationalen Arginylierung beeinflusst wird, zu dessen Zusammenhang mit Diabetes jedoch zurzeit noch keine Daten vorliegen (Leite et al., 2016).

Zusammenfassend kann für die erhöhte Phosphorylierung von S11878 und unveränderte Phosphorylierung von S12022 im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* nicht die PKC $\alpha$  verantwortlich sein, da sich ihre Aktivität vermindert zeigte. Hierfür könnte eine erhöhte Aktivität

der CaMKII $\delta$  oder ein anderer Mechanismus verantwortlich sein, der sowohl von genetischen Faktoren als auch vom Glukose- und Insulinstoffwechsel beeinflusst wird (Abb. 19). Oxidativer Stress, Disulfidbrückenbindungen, reversible S-Glutathionylierungen oder posttranslationale Arginylierungen könnten dafür verantwortlich sein, dass die passive Steifigkeit der Skelettmuskulatur des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* trotz erhöhter Phosphorylierung von PEVK an S11878 reduziert ist (Abb. 18). Zukünftige Studien sollten eine umfassendere Analyse der Titinmodifikationen durch Typ-2-Diabetes in der Skelettmuskulatur untersuchen.

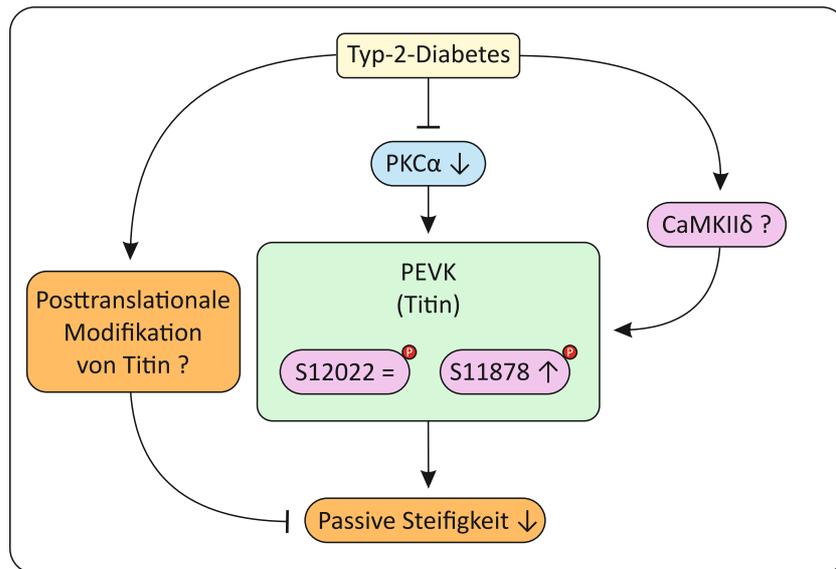


Abb. 18: **Hypothese zum Einfluss von Typ-2-Diabetes auf das Sarkomerprotein Titin im Skelettmuskel.** Für die erhöhte Phosphorylierung von S11878 und unveränderte Phosphorylierung von S12022 kann die Proteinkinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) nicht verantwortlich sein, da sich ihre Aktivität vermindert zeigte. Hierfür könnte eine erhöhte Aktivität der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) verantwortlich sein, die sowohl von genetischen Faktoren als auch vom Glukose- und Insulinstoffwechsel beeinflusst werden könnte. Oxidativer Stress, Disulfidbrückenbindungen, reversible S-Glutathionylierungen oder posttranslationale Arginylierungen könnten dafür verantwortlich sein, dass die passive Steifigkeit der Skelettmuskulatur des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* trotz erhöhter Phosphorylierung von PEVK an S11878 reduziert ist.

### 4.3 Auswirkung von Typ-2-Diabetes auf die Protein-Qualitätskontrolle

Dem Sarkomerprotein Titin wurde bereits in mehreren Studien eine wichtige Funktion in der Protein-Qualitätskontrolle zugesprochen (Centner et al., 2001; Pizon et al., 2002; Kötter et al., 2014a). Eine geregelte Degradation der Proteinstrukturen im Sarkomer ist zudem für den Erhalt der komplexen Skelettmuskelfunktion essenziell (Mitch und Goldberg, 1996; Waterlow et al., 1978). Um den Zusammenhang zwischen dem Typ-2-Diabetes, dem Sarkomerprotein Titin und der

Protein-Qualitätskontrolle im Skelettmuskel zu untersuchen wurde zunächst die Degradation von Titin anhand des T2/T1 Verhältnisses untersucht. Dieses blieb im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* unverändert, sodass hier möglicherweise keine verminderte Titin-Degradation vorliegt. Um den Einfluss von Typ-2-Diabetes auf die Autophagie-Prozesse zu analysieren wurde zusätzlich die relative Expression der zwei Autophagie-Marker p62 und LC3B II analysiert.

Übergewicht und Mangel an körperlicher Bewegung, zwei der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Typ-2-Diabetes, führen zu einem Energieüberschuss in der Zelle, welcher eine verminderte Aktivität der Autophagie-Prozesse zur Folge hat (Kahn et al., 2005; Wu et al., 2014; Ye, 2013). Das Adapterprotein p62 ist für die Erkennung der abzubauenen Substrate durch die Autophagie-Prozesse notwendig; es bindet über seine UBA-Domäne an das Substrat und über seine LIR-Domäne und LC3 an die innere Membran der Phagophore (Pankiv et al., 2007). Bei der Autophagie wird es schließlich mit dem Substrat zusammen abgebaut, sodass eine verminderte Autophagie-Aktivität durch eine Akkumulation von p62 gekennzeichnet wäre (Bjørkøy et al., 2005). Zudem interagiert p62 auch mit der Titinkinase-Domäne, daher wird vermutet, dass das Sarkomerprotein Titin auch über Autophagie-Prozesse abgebaut werden kann (Lange et al., 2005; Müller et al., 2021). Das Adapterprotein p62 zeigte sich im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* unverändert, sodass anhand von p62 nicht von einer verminderten Aktivität der Autophagie-Prozesse ausgegangen werden kann. Die Interpretation der Aktivität der Autophagie-Prozesse allein mit p62 wird jedoch nicht empfohlen, da p62 auch im proteosomalen Abbau involviert ist (Klionsky et al., 2008). Aus diesem Grund wurde auch das LC3B II/I Verhältnis analysiert. LC3B II wird bei der Verlängerung der Phagophore in dessen Membran eingebaut und wird aus bei Konjugation von LC3B I mit Phosphatidylethanolamin (PE) durch ATG7 und ATG3 aktiviert. (Hale et al., 2013). Das LC3B II/I Verhältnis zeigte sich im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* signifikant reduziert und bedeutet, dass im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* möglicherweise eine verminderte Aktivität der Autophagie-Prozesse vorliegt. Das verminderte LC3B II/I Verhältnis sollte jedoch ebenso wie p62 nicht allein interpretiert werden, da es sowohl bei einer verminderten Aktivität der Autophagie-Prozesse als auch bei einem schnellen lysosomalen Abbau der Autophagosomen auftreten kann (Klionsky et al., 2008). Das unveränderte T2/T1 Verhältnis, das unveränderte p62 und das statistisch signifikant verminderte LC3B II/I Verhältnis zeigen somit, dass beim Typ-2-Diabetes eine verminderte Aktivität der Autophagie-Prozesse vorliegen könnte (Abb. 19). Es ist jedoch unklar, ob das unveränderte p62 vom proteosomalen Abbau und das verminderte LC3B II/I Verhältnis vom lysosomalen Abbau der Autophagosomen beeinflusst wurde. Ob es gleichzeitig zu einer veränderten Aktivität des UPS kommt, bleibt ungeklärt, da die notwendigen Marker hierfür nicht untersucht wurden.

Weitere Arbeiten zeigten, dass bei einer Insulinresistenz durch die erhöhte Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zellen, oxidativem Stress sowie Stress des endoplasmatischen Retikulums entstehen, vor denen die  $\beta$ -Zellen bei einer Störung der Autophagie-Prozesse nicht geschützt werden können (Kroemer et al., 2010; Ogihara und Mirmira, 2010; Rahier et al., 2008). Die Folge davon ist eine  $\beta$ -Zellinsuffizienz (Watada und Fujitani, 2015). Interessanterweise zeigte sich im genetisch veränderten ZSF1-*Lean* Rattenmodell, in welchem den Ratten keine Glukoseintoleranz durch eine Diät induziert wird, im Vergleich zum Wistar-Wildtyp Rattenmodell, bei welchem keine genetische Veränderung vorliegt, ein tendenziell vermindertes T2/T1 Verhältnis, sowie ein statistisch signifikant reduziertes LC3B II/I Verhältnis. Dies deutet daraufhin, dass die Funktion der Autophagie-Prozesse von der genetischen Veranlagung abhängig und bereits vor dem Eintreten einer Glukoseintoleranz beeinträchtigt sein könnte (Abb. 19). Eine Störung der Autophagie-Prozesse, die in der Entstehung der  $\beta$ -Zellinsuffizienz involviert ist, könnte somit zum genetischen Einfluss auf die Entstehung der  $\beta$ -Zellinsuffizienz beitragen und eine bedeutende Rolle in der Entstehung des Typ-2-Diabetes spielen (Szoke und Gerich, 2005).

Der direkte Einfluss der Autophagie-Prozesse auf die Skelettmuskelfunktion wurde in vergangenen Arbeiten kontrovers diskutiert (Sandri, 2008; Jiao und Demontis, 2017). Andere Arbeiten haben gezeigt, dass die erhaltene Protein-Qualitätskontrolle den Abbau von Proteinen ermöglicht und eine Anhäufung dieser verhindert (Vos et al., 2008). Zudem haben Kötter et al. gezeigt, dass die Anhäufung von Titin die passive Steifigkeit von Myozyten beeinträchtigt und, dass eine erhaltene Funktion der Protein-Qualitätskontrolle dies verhindern kann (Kötter et al., 2014b). Möglicherweise zeigt hier das verminderte LC3B II/I Verhältnis auf eine Störung der Protein-Qualitätskontrolle, die zu einem gestörten Abbau und einer Akkumulation von Titin oder anderen Proteinen im Skelettmuskel des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* führt und eine gestörte Skelettmuskelfunktion im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zur Folge hat (Abb. 19).

Zusammenfassend zeigt das verminderte LC3B II/I Verhältnis im ZSF1-*Obese* Rattenmodell, dass beim Typ-2-Diabetes eine verminderte Aktivität der Autophagie-Prozesse vorliegen könnte. Möglicherweise führt diese zu einem gestörten Abbau und einer Akkumulation von Titin oder anderen Proteinen im Skelettmuskel, was eine gestörte Skelettmuskelfunktion im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zur Folge hat. Dass sich im Vergleich zum genetisch unveränderten Wistar-Wildtyp sowohl im ZSF1-*Lean* als auch im ZSF1-*Obese* Rattenmodell ein tendenziell vermindertes T2/T1 Verhältnis, sowie ein statistisch signifikant reduziertes LC3B II/I Verhältnis zeigten, könnte darauf hindeuten, dass die Funktion der Autophagie-Prozesse von der genetischen Veranlagung abhängig und bereits vor dem Eintreten einer Glukoseintoleranz beeinträchtigt ist und

somit zum genetischen Einfluss in der Entstehung der  $\beta$ -Zellinsuffizienz und des Typ-2-Diabetes beiträgt (Abb. 19).

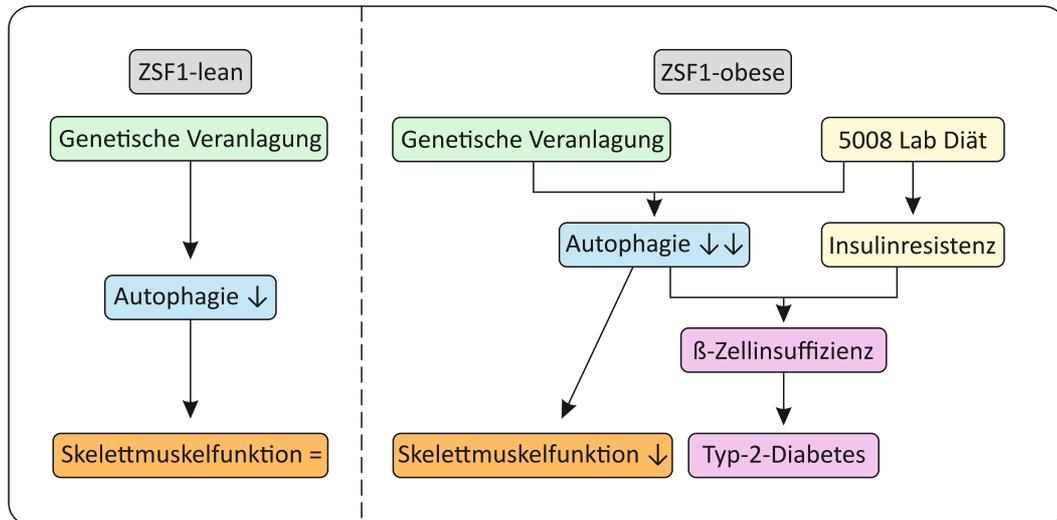


Abb. 19: **Hypothese zum Zusammenhang zwischen Typ-2-Diabetes und die Autophagie-Prozesse.** Die Funktion der Autophagie-Prozesse könnte im ZSF1-*Lean* und ZSF1-*Obese* Rattenmodell von der genetischen Veranlagung abhängig und bereits vor dem Eintreten einer Glukoseintoleranz beeinträchtigt sein. Dadurch entsteht ein gestörter Abbau und die Akkumulation von Titin im Skelettmuskel, die im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* nach der Induktion einer Insulinresistenz die  $\beta$ -Zellinsuffizienz mitverursacht und somit zur Entstehung des Typ-2-Diabetes führt. Zusätzlich könnte die Induktion der Insulinresistenz durch die 5008 Lab Diät bei vorliegendem gestörtem Abbau und Akkumulation von Titin im Skelettmuskel des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* eine gestörte Skelettmuskelfunktion verursachen.

#### 4.4 Vergleich verschiedener Auswirkungen von Typ-2-Diabetes auf Herz- und Skelettmuskulatur

Die chronische Herzinsuffizienz und der Typ-2-Diabetes weisen eine hohe Komorbidität, gemeinsame Risikofaktoren sowie vernetzte Pathomechanismen auf und sind somit zwei eng miteinander verbundene Krankheitsbilder. Aus diesem Gründen wurden die neuen Erkenntnisse zur Auswirkung des Typ-2-Diabetes auf die Skelettmuskelfunktion und das Sarkomerprotein Titin mit Daten aus Studien zu Herzmuskelzellen verglichen und mit der chronischen Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht.

Hopf et al. haben gezeigt, dass der Typ-2-Diabetes zu einer erhöhten passiven Steifigkeit von Kardiomyozyten führt (Hopf et al., 2018). Im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zeigte sich in den hier vorliegenden Daten die passive Steifigkeit vermindert. Mögliche Gründe für die verschiedenen Ergebnisse in Kardiomyozyten und in den hier untersuchten Quadriceps-

Muskelfaserbündel könnten die verschiedenen Methoden, die gewebedingt für die Messung der passiven Steifigkeit verwendet wurden oder einen unterschiedlich starken Einfluss der extrazellulären Matrix auf die passive Steifigkeit der verschiedenen Proben sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Typ-2-Diabetes zu verschiedenen Modifikationen von Titin in Herz- und Skelettmuskulatur führt.

Hopf et al. demonstrierten auch, dass bei Typ-2-Diabetes in Kardiomyozyten ein erhöhter Anteil der längeren Titin N2BA-Isoform vorliegt (Hopf et al., 2018). Im Vergleich zur Herzmuskulatur, bei welcher durch eine Änderung des Titin Isoform-Verhältnisses die Steifigkeit des Sarkomers angepasst werden kann, ist dies in der Skelettmuskulatur nicht der Fall (Freiburg et al., 2000). Daher wurden die Titin-Isoformen in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Das Molekulargewicht von der, in der Quadriceps-Muskulatur vorhandenen Titin Isoform N2A wurde jedoch untersucht und zeigte sich dabei im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* unverändert (Prado et al., 2005). Der erhöhte Anteil der längeren Titin N2BA-Isoform in Kardiomyozyten und das unveränderte Molekulargewicht der N2A-Isoform in der Quadriceps-Muskulatur können daher nicht den Unterschied zwischen der erhöhten passiven Steifigkeit in Kardiomyozyten und der verminderten passiven Steifigkeit in Quadriceps-Muskelfaserbündel erklären.

Zudem stellten Hopf et al. fest, dass die Phosphorylierung von Titin an der N2Bus, welche zu einer Minderung der Steifigkeit führt, bei Typ-2-Diabetes in Kardiomyozyten vermindert ist (Hopf et al., 2018; Krüger et al., 2009). Da N2Bus im Titin der Skelettmuskulatur nicht vorhanden ist, könnte die verminderte Phosphorylierung von Titin an der N2Bus in Kardiomyozyten erklären, warum die passive Steifigkeit in Kardiomyozyten erhöht und in Quadriceps-Muskelfaserbündel vermindert ist (Linke, 2008).

Des Weiteren zeigten Hopf et al., dass die Phosphorylierung der Titin-Domäne PEVK an S11878 durch eine erhöhte PKC $\alpha$ -Aktivität bei Typ-2-Diabetes in Kardiomyozyten erhöht ist. In der Skelettmuskulatur vom diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* zeigte sich die Phosphorylierung von PEVK an S11878 ebenfalls erhöht, die PKC $\alpha$ -Aktivität jedoch vermindert. Daher könnte es sein, dass es in der Skelettmuskulatur vom diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine weitere Phosphorylierungsstelle von Titin für PKC $\alpha$  gibt, die möglicherweise hypophosphoryliert ist und erklären könnte, warum die passive Steifigkeit in Quadriceps-Muskelfaserbündel vermindert ist. Dass PEVK an S11878 trotz verminderter PKC $\alpha$ -Aktivität erhöht ist, könnte auch durch die CaMKII $\delta$  erklärt werden, für welche bereits eine Phosphorylierung von Titin in der PEVK-Region beschrieben wurde (Hamdani et al., 2013b; Hidalgo et al., 2013). Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass bei Typ-2-Diabetes eine erhöhte CaMKII $\delta$ -Aktivität bereits in Kardiomyozyten festgestellt wurde (Erickson et al., 2013). Des Weiteren wurde in anderen Arbeiten auch bei Herzinsuffizienz eine erhöhte CaMKII $\delta$ -Aktivität beschrieben (Hoch et al., 1999; Anderson et al.,

2011). Somit könnte CaMKII $\delta$  möglicherweise eine gemeinsame pathologische Störung bei Herzinsuffizienz und Typ-2-Diabetes aufweisen, welche in Herz- und Skelettmuskulatur vorkommt und ein interessanter Ansatz zur Forschung von weiteren Therapiemöglichkeiten zu diesen Erkrankungen darstellen.

Weitere Gründe dafür, dass die passive Steifigkeit in Kardiomyozyten erhöht und in Quadriceps-Muskelfaserbündel vermindert ist könnten, wie bereits in vorherigen Kapiteln besprochen, weitere Titin-Modifikationen, oxidativer Stress, Disulfidbrückenbindungen, reversible S-Glutathionylierungen oder posttranslationale Arginylierungen sein, deren umfassendere Analyse das Thema zukünftiger Studien sein wird.

### 4.5 Schlussfolgerungen

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Typ-2-Diabetes in Quadriceps-Muskelfaserbündel des diabetischen Rattenmodells ZSF1-*Obese* zu einer reduzierten passiven Steifigkeit führt, welche durch Titin oder die Extrazelluläre Matrix verursacht sein könnte (Berria et al., 2006; Brynnel et al., 2018; Lee et al., 2020; Wang et al., 1993). Zusätzlich wurde im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine tendenziell verminderte aktive Kraftentwicklung festgestellt, welche die Daten anderer Studien von verschiedenen diabetischen Tiermodellen und klinischer Studien von, an Diabetes-Typ-2 erkrankten Patienten unterstützt (Kalyani et al., 2015; Schauer et al., 2020). Dass die reduzierte passive Steifigkeit in den hier untersuchten Quadriceps-Muskelfaserbündel eine tendenziell verminderte aktive Kraftentwicklung zur Folge hat, könnte, neben der Möglichkeit, dass sich die reduzierte passive Steifigkeit direkt negativ auf die aktive Kraftentwicklung auswirkt, durch eine Störung der Calcium-Sensitivität und der Calcium-abhängigen Signalwege erklärt werden (Erickson et al., 2013; Ng et al., 2022).

Um die Beteiligung von Titin an der gestörten Skelettmuskelfunktion zu untersuchen, erfolgte die Analyse von post-translationalen Modifikationen von Titin. Hierbei zeigte sich im diabetischen Rattenmodell ZSF1-*Obese* eine erhöhte Phosphorylierung von PEVK an S11878 und unveränderte Phosphorylierung an S12022. Da die Aktivität der PKC $\alpha$  vermindert war, könnte eine erhöhte Aktivität der CaMKII $\delta$  oder ein anderer Mechanismus zur Phosphorylierung von PEVK beigetragen haben (Erickson et al., 2013; Hamdani et al., 2013b; Hidalgo et al., 2013). Dass die passive Steifigkeit trotz erhöhter Phosphorylierung von PEVK an S11878 vermindert war, könnte durch oxidativen Stress, Disulfidbrückenbindungen, reversible S-Glutathionylierungen oder posttranslationale Arginylierungen erklärt werden (Beckendorf und Linke, 2015; Leite et al., 2016).

Die Analyse der Titin-Degradation und der zentralen Autophagie-Prozesse zeigte durch ein vermindertes LC3B II/I Verhältnis im ZSF1-*Obese* Rattenmodell, dass beim Typ-2-Diabetes eine

verminderte Aktivität der Autophagie-Prozesse vorliegen könnte, welche zu einer Akkumulation von Titin im Skelettmuskel beitragen und eine gestörte Skelettmuskelfunktion im diabetischen Rattenmodell *ZSF1-Obese* mitverursachen könnte (Kötter et al., 2014b). Dass sich auch im genetisch veränderten Rattenmodell *ZSF1-Lean* ein tendenziell vermindertes T2/T1 Verhältnis sowie ein statistisch signifikant reduziertes LC3B II/I Verhältnis zeigten, könnte darauf hinweisen, dass die Funktion der Autophagie-Prozesse von der genetischen Veranlagung abhängig ist und somit zum genetischen Einfluss in der Entstehung der  $\beta$ -Zellinsuffizienz und des Typ-2-Diabetes beiträgt.

Der Vergleich mit Daten aus Studien zu Herzmuskelzellen zeigte, dass der Typ-2-Diabetes in Kardiomyozyten im Gegensatz zu Quadriceps-Muskelfaserbündel zu einer erhöhten passiven Steifigkeit führt (Hopf et al., 2018). Verschiedene Modifikationen von Titin in Herz- und Skelettmuskulatur könnten mögliche Gründe dafür sein. Eine Möglichkeit wäre die verminderte Phosphorylierung der Titin-N2Bus bei Typ-2-Diabetes in Kardiomyozyten, da N2Bus im Titin der Skelettmuskulatur nicht vorhanden ist (Hopf et al., 2018). Des Weiteren ist die Aktivität der PKC $\alpha$  bei Typ-2-Diabetes in Kardiomyozyten im Gegensatz zur Skelettmuskulatur erhöht (Hopf et al., 2018). Daher könnte es auch sein, dass es in der Skelettmuskulatur eine weitere Phosphorylierungsstelle an Titin für die PKC $\alpha$  gibt, dessen Phosphorylierung möglicherweise vermindert ist und erklären könnte, warum die passive Steifigkeit in Quadriceps-Muskelfaserbündel vermindert ist. In dieser Arbeit wurde nahegelegt, dass die Aktivität der CaMKII $\delta$  in der Skelettmuskulatur des diabetischen Rattenmodells *ZSF1-Obese* erhöht sein könnte. Falls diese Vermutung in zukünftigen Studien bestätigt wird, könnte die CaMKII $\delta$  Teil einer gemeinsamen pathologische Störung bei Herzinsuffizienz und Typ-2-Diabetes sein, welche in Herz- und Skelettmuskulatur vorkommt und somit ein interessanter weiterer Forschungsansatz sein (Anderson et al., 2011; Erickson et al., 2013; Hoch et al., 1999).

## 5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Agarkova, I. & Perriard, J. C. **2005**. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol*, 15, 477-85.
- Andersen, H., Nielsen, S., Mogensen, C. E. & Jakobsen, J. **2004**. Muscle strength in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, 1543-8.
- Anderson, M. E., Brown, J. H. & Bers, D. M. **2011**. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 468-73.
- Aroor, A. R., Mandavia, C. H. & Sowers, J. R. **2012**. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. *Heart Fail Clin*, 8, 609-17.
- Attaix, D., Mosoni, L., Dardevet, D., Combaret, L., Mirand, P. P. & Grizard, J. **2005**. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 1962-73.
- Babu, J. R., Geetha, T. & Wooten, M. W. **2005**. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J Neurochem*, 94, 192-203.
- Bang, M. L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A. J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C. C., Labeit, D., Gregorio, C. C., Granzier, H. & Labeit, S. **2001**. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 89, 1065-72.
- Bard, J. a. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C. & Martin, A. **2018**. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*, 87, 697-724.
- Bardag-Gorce, F., Francis, T., Nan, L., Li, J., He Lue, Y., French, B. A. & French, S. W. **2005**. Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life Sci*, 77, 2594-602.
- Beckendorf, L. & Linke, W. A. **2015**. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 25-36.
- Berria, R., Wang, L., Richardson, D. K., Finlayson, J., Belfort, R., Pratipanawatr, T., De Filippis, E. A., Kashyap, S. & Mandarino, L. J. **2006**. Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290, E560-5.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. & Johansen, T. **2005**. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171, 603-14.
- Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V. & Ruiz-Albusac, J. M. **2014**. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 161.
- Bouzakri, K., Karlsson, H. K., Vestergaard, H., Madsbad, S., Christiansen, E. & Zierath, J. R. **2006**. IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance in skeletal muscle from pancreas transplant recipients. *Diabetes*, 55, 785-91.

- Brynnel, A., Hernandez, Y., Kiss, B., Lindqvist, J., Adler, M., Kolb, J., Van Der Pijl, R., Gohlke, J., Strom, J., Smith, J., Ottenheijm, C. & Granzier, H. L. **2018**. Downsizing the molecular spring of the giant protein titin reveals that skeletal muscle titin determines passive stiffness and drives longitudinal hypertrophy. *Elife*, 7.
- Centner, T., Yano, J., Kimura, E., Mcelhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., Bang, M. L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C. C., Sorimachi, H. & Labeit, S. **2001**. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol*, 306, 717-26.
- Chatterjee, S., Khunti, K. & Davies, M. J. **2017**. Type 2 diabetes. *Lancet*, 389, 2239-2251.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K. & Varshavsky, A. **1989**. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, 243, 1576-83.
- Ciechanover, A. **1994**. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79, 13-21.
- Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. L. **1996**. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, 65, 801-47.
- Cuervo, A. M. & Dice, J. F. **1998**. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med (Berl)*, 76, 6-12.
- Defronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A. & Weiss, R. **2015**. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15019.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J. L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S. R. & Mitch, W. E. **2004**. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*, 113, 115-23.
- Dutta, S., Tsiros, C., Sundar, S. L., Athar, H., Moore, J., Nelson, B., Gage, M. J. & Nishikawa, K. **2018**. Calcium increases titin N2A binding to F-actin and regulated thin filaments. *Sci Rep*, 8, 14575.
- Ehler, E. & Gautel, M. **2008**. The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 642, 1-14.
- Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R. J., Despa, F., Hart, G. W., Ripplinger, C. M. & Bers, D. M. **2013**. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, 502, 372-6.
- Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougousse, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J. S., Gregorio, C. C., Granzier, H. & Labeit, S. **2000**. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 86, 1114-21.
- Frontera, W. R. & Ochala, J. **2015**. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96, 183-95.

- Fürst, D. O., Osborn, M., Nave, R. & Weber, K. **1988**. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 106, 1563-72.
- Gautel, M., Goulding, D., Bullard, B., Weber, K. & Fürst, D. O. **1996**. The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 11), 2747-54.
- Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. **2010**. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, 3-12.
- Glickman, M. H. & Ciechanover, A. **2002**. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82, 373-428.
- Gräter, F., Shen, J., Jiang, H., Gautel, M. & Grubmüller, H. **2005**. Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys J*, 88, 790-804.
- Greenman, A. C., Diffie, G. M., Power, A. S., Wilkins, G. T., Gold, O. M. S., Erickson, J. R. & Baldi, J. C. **2021**. Increased myofilament calcium sensitivity is associated with decreased cardiac troponin I phosphorylation in the diabetic rat heart. *Exp Physiol*, 106, 2235-2247.
- Groop, L. C., Bonadonna, R. C., Delprato, S., Ratheiser, K., Zyck, K., Ferrannini, E. & DeFronzo, R. A. **1989**. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest*, 84, 205-13.
- Haas, A. L. & Rose, I. A. **1982**. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem*, 257, 10329-37.
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. & Lippincott-Schwartz, J. **2010**. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141, 656-67.
- Hale, A. N., Ledbetter, D. J., Gawriluk, T. R. & Rucker, E. B., 3rd **2013**. Autophagy: regulation and role in development. *Autophagy*, 9, 951-72.
- Hamdani, N., Franssen, C., Lourenço, A., Falcão-Pires, I., Fontoura, D., Leite, S., Plettig, L., López, B., Ottenheijm, C. A., Becher, P. M., González, A., Tschöpe, C., Díez, J., Linke, W. A., Leite-Moreira, A. F. & Paulus, W. J. **2013a**. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail*, 6, 1239-49.
- Hamdani, N., Krysiak, J., Kreuzer, M. M., Neef, S., Dos Remedios, C. G., Maier, L. S., Krüger, M., Backs, J. & Linke, W. A. **2013b**. Crucial role for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res*, 112, 664-74.
- Harding, J. L., Pavkov, M. E., Magliano, D. J., Shaw, J. E. & Gregg, E. W. **2019**. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*, 62, 3-16.
- Hasselgren, P. O. & Fischer, J. E. **2001**. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg*, 233, 9-17.

- Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., Labeit, D., Labeit, S. & Sorimachi, H. **2008**. Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 283, 14801-14.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. & Yamamoto, A. **2009**. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 11, 1433-7.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. **1983**. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 258, 8206-14.
- Hidalgo, C., Hudson, B., Bogomolovas, J., Zhu, Y., Anderson, B., Greaser, M., Labeit, S. & Granzier, H. **2009**. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105, 631-8, 17 p following 638.
- Hidalgo, C. G., Chung, C. S., Saripalli, C., Methawasin, M., Hutchinson, K. R., Tsapralis, G., Labeit, S., Mattiazzi, A. & Granzier, H. L. **2013**. The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII $\delta$ ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol*, 54, 90-7.
- Hikida, R. S. **2011**. Aging changes in satellite cells and their functions. *Curr Aging Sci*, 4, 279-97.
- Hirata, Y., Nomura, K., Senga, Y., Okada, Y., Kobayashi, K., Okamoto, S., Minokoshi, Y., Imamura, M., Takeda, S., Hosooka, T. & Ogawa, W. **2019**. Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via a WWP1/KLF15 axis. *JCI Insight*, 4.
- Hoch, B., Meyer, R., Hetzer, R., Krause, E. G. & Karczewski, P. **1999**. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, 84, 713-21.
- Hofmann, K. & Bucher, P. **1996**. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci*, 21, 172-3.
- Hopf, A. E., Andresen, C., Kötter, S., Isić, M., Ulrich, K., Sahin, S., Bongardt, S., Röhl, W., Drove, F., Scheerer, N., Vandekerckhove, L., De Keulenaer, G. W., Hamdani, N., Linke, W. A. & Krüger, M. **2018**. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res*, 123, 342-355.
- Horowitz, R., Maruyama, K. & Podolsky, R. J. **1989**. Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J Cell Biol*, 109, 2169-76.
- Horwich, T. B. & Fonarow, G. C. **2010**. Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes relevance to incidence of heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 55, 283-93.
- Howarth, F. C. & Qureshi, M. A. **2008**. Myofilament sensitivity to Ca<sup>2+</sup> in ventricular myocytes from the Goto-Kakizaki diabetic rat. *Mol Cell Biochem*, 315, 69-74.
- Howarth, F. C., Qureshi, M. A., Hassan, Z., Al Kury, L. T., Isaev, D., Parekh, K., Yammahi, S. R., Oz, M., Adrian, T. E. & Adeghate, E. **2011**. Changing pattern of gene expression is associated with

ventricular myocyte dysfunction and altered mechanisms of Ca<sup>2+</sup> signalling in young type 2 Zucker diabetic fatty rat heart. *Exp Physiol*, 96, 325-37.

<https://Diabetesatlas.Org> **2021**. IDF Diabetes Atlas *Ninth edition*, Zugriff am 01.05.2021.

Huxley, H. & Hanson, J. **1954**. Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature*, 173, 973-976.

James, H. A., O'Neill, B. T. & Nair, K. S. **2017**. Insulin Regulation of Proteostasis and Clinical Implications. *Cell Metab*, 26, 310-323.

Jiao, J. & Demontis, F. **2017**. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Curr Opin Pharmacol*, 34, 1-6.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. **2000**. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j*, 19, 5720-8.

Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D. G. **2005**. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 1, 15-25.

Kalyani, R. R., Corriere, M. & Ferrucci, L. **2014**. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2, 819-29.

Kalyani, R. R., Metter, E. J., Egan, J., Golden, S. H. & Ferrucci, L. **2015**. Hyperglycemia predicts persistently lower muscle strength with aging. *Diabetes Care*, 38, 82-90.

Kannel, W. B., Hjortland, M. & Castelli, W. P. **1974**. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*, 34, 29-34.

Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A. & Lernmark, Å. **2017**. Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17016.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. L. **2011**. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.

Kleinschmidt, J. A., Hügle, B., Grund, C. & Franke, W. W. **1983**. The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. I. Biochemical and electron microscopic characterization. *Eur J Cell Biol*, 32, 143-56.

Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., Bamber, B. A., Bassham, D. C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J. S., Bredesen, D. E., Brodsky, J. L., Brumell, J. H., Brunk, U. T., Bursch, W., Camougrand, N., Cebollero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, L. S., Choi, A., Chu, C. T., Chung, J., Clarke, P. G., Clark, R. S., Clarke, S. G., Clavé, C., Cleveland, J. L., Codogno, P., Colombo, M. I., Coto-Montes, A., Cregg, J. M., Cuervo, A. M., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, P. B., Dennis, P. A., Deretic, V., Devenish, R. J., Di Sano, F., Dice, J. F., Difiglia, M., Dinesh-Kumar, S., Distelhorst, C. W., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, F. C., Dröge, W., Dron, M., Dunn, W. A., Jr., Duszenko, M., Eissa, N. T., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, E. L., Fésüs, L., Finley, K. D., Fuentes, J. M., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, F. B., Gewirtz, D. A., Gibson, S. B., Gohla, A., Goldberg, A. L., Gonzalez, R., González-Estévez, C., Gorski, S.,

- Gottlieb, R. A., Häussinger, D., He, Y. W., Heidenreich, K., Hill, J. A., Høyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, W. P., Iwasaki, A., Jäättelä, M., Jackson, W. T., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, J. U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D. H., Kiel, J. A., Kim, H. P., Kimchi, A., Kinsella, T. J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., et al. **2008**. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151-75.
- Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M. L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., Mckenna, W., Yokoyama, M., Schork, N. J., Omens, J. H., Mcculloch, A. D., Kimura, A., Gregorio, C. C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H. P. & Chien, K. R. **2002**. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111, 943-55.
- Kolmerer, B., Olivieri, N., Witt, C. C., Herrmann, B. G. & Labeit, S. **1996**. Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol*, 256, 556-63.
- Komander, D. & Rape, M. **2012**. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 81, 203-29.
- Kötter, S., Andresen, C. & Krüger, M. **2014a**. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem*, 395, 1341-52.
- Kötter, S., Gout, L., Von Frieling-Salewsky, M., Müller, A. E., Helling, S., Marcus, K., Dos Remedios, C., Linke, W. A. & Krüger, M. **2013**. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99, 648-56.
- Kötter, S., Unger, A., Hamdani, N., Lang, P., Vorgerd, M., Nagel-Steger, L. & Linke, W. A. **2014b**. Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. *J Cell Biol*, 204, 187-202.
- Kroemer, G., Mariño, G. & Levine, B. **2010**. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40, 280-93.
- Krüger, M., Babicz, K., Von Frieling-Salewsky, M. & Linke, W. A. **2010**. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 910-6.
- Krüger, M., Kötter, S., Grützner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M. M., Butt, E., Dos Remedios, C. G. & Linke, W. A. **2009**. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 104, 87-94.
- Krüger, M. & Linke, W. A. **2009**. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 46, 490-8.
- Krüger, M. & Linke, W. A. **2011**. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem*, 286, 9905-12.
- Kulkarni, R. N., Brüning, J. C., Winnay, J. N., Postic, C., Magnuson, M. A. & Kahn, C. R. **1999**. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, 96, 329-39.

- Kuusisto, E., Salminen, A. & Alafuzoff, I. **2001**. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport*, 12, 2085-90.
- Labeit, S. & Kolmerer, B. **1995**. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270, 293-6.
- Lamark, T., Perander, M., Outzen, H., Kristiansen, K., Øvervatn, A., Michaelsen, E., Bjørkøy, G. & Johansen, T. **2003**. Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J Biol Chem*, 278, 34568-81.
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L. G., Hughes, S. M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edström, L., Ehler, E., Udd, B. & Gautel, M. **2005**. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308, 1599-603.
- Lee, E. H., Gao, M., Pinotsis, N., Wilmanns, M. & Schulten, K. **2006**. Mechanical strength of the titin Z1Z2-telethonin complex. *Structure*, 14, 497-509.
- Lee, E. J., Jang, H. C., Koo, K. H., Kim, H. Y. & Lim, J. Y. **2020**. Mechanical Properties of Single Muscle Fibers: Understanding Poor Muscle Quality in Older Adults with Diabetes. *Ann Geriatr Med Res*, 24, 267-273.
- Leite, F. S., Minozzo, F. C., Kalganov, A., Cornachione, A. S., Cheng, Y. S., Leu, N. A., Han, X., Saripalli, C., Yates, J. R., 3rd, Granzier, H., Kashina, A. S. & Rassier, D. E. **2016**. Reduced passive force in skeletal muscles lacking protein arginylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 310, C127-35.
- Levelt, E., Mahmood, M., Piechnik, S. K., Ariga, R., Francis, J. M., Rodgers, C. T., Clarke, W. T., Sabharwal, N., Schneider, J. E., Karamitsos, T. D., Clarke, K., Rider, O. J. & Neubauer, S. **2016**. Relationship Between Left Ventricular Structural and Metabolic Remodeling in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 65, 44-52.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. & Levine, B. **1999**. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672-6.
- Linke, W. A. **2008**. Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction†. *Cardiovascular Research*, 77, 637-648.
- Linke, W. A. **2018**. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annu Rev Physiol*, 80, 389-411.
- Linke, W. A., Ivemeyer, M., Labeit, S., Hinssen, H., Rüegg, J. C. & Gautel, M. **1997**. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys J*, 73, 905-19.
- Linke, W. A., Ivemeyer, M., Olivieri, N., Kolmerer, B., Rüegg, J. C. & Labeit, S. **1996**. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol*, 261, 62-71.
- Linke, W. A. & Krüger, M. **2010**. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda)*, 25, 186-98.

- Linke, W. A., Rudy, D. E., Centner, T., Gautel, M., Witt, C., Labeit, S. & Gregorio, C. C. **1999**. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol*, 146, 631-44.
- Luo, J., Sobkiw, C. L., Hirshman, M. F., Logsdon, M. N., Li, T. Q., Goodyear, L. J. & Cantley, L. C. **2006**. Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell Metab*, 3, 355-66.
- Macdonald, M. R., Petrie, M. C., Varyani, F., Ostergren, J., Michelson, E. L., Young, J. B., Solomon, S. D., Granger, C. B., Swedberg, K., Yusuf, S., Pfeffer, M. A. & McMurray, J. J. **2008**. Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme. *Eur Heart J*, 29, 1377-85.
- Marasco, M. R. & Linnemann, A. K. **2018**.  $\beta$ -Cell Autophagy in Diabetes Pathogenesis. *Endocrinology*, 159, 2127-2141.
- Martin, B. C., Warram, J. H., Krolewski, A. S., Bergman, R. N., Soeldner, J. S. & Kahn, C. R. **1992**. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*, 340, 925-9.
- Massey, A., Kiffin, R. & Cuervo, A. M. **2004**. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2420-34.
- Mayans, O., Van Der Ven, P. F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Fürst, D. O., Wilmanns, M. & Gautel, M. **1998**. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*, 395, 863-9.
- Mindell, J. A. **2012**. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 74, 69-86.
- Mitch, W. E. & Goldberg, A. L. **1996**. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med*, 335, 1897-905.
- Mizushima, N. & Hara, T. **2006**. Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration? *Autophagy*, 2, 302-4.
- Mizushima, N. & Yoshimori, T. **2007**. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-5.
- Mrosek, M., Labeit, D., Witt, S., Heerklotz, H., Von Castelmur, E., Labeit, S. & Mayans, O. **2007**. Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin. *The FASEB Journal*, 21, 1383-1392.
- Mukund, K. & Subramaniam, S. **2020**. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 12, e1462.
- Muller, D. C., Elahi, D., Tobin, J. D. & Andres, R. **1996**. Insulin response during the oral glucose tolerance test: the role of age, sex, body fat and the pattern of fat distribution. *Aging (Milano)*, 8, 13-21.
- Müller, E., Salcan, S., Bongardt, S., Barbosa, D. M., Krüger, M. & Kötter, S. **2021**. E3-ligase knock down revealed differential titin degradation by autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Sci Rep*, 11, 21134.

- Müller, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H. & Mayer, A. **2000**. Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J Cell Biol*, 151, 519-28.
- Nakaso, K., Yoshimoto, Y., Nakano, T., Takeshima, T., Fukuhara, Y., Yasui, K., Araga, S., Yanagawa, T., Ishii, T. & Nakashima, K. **2004**. Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease. *Brain Res*, 1012, 42-51.
- Ng, Y. H., Lamberts, R. R., Jones, P. P., Sammut, I. A., Diffie, G. M., Wilkins, G. T. & Baldi, J. C. **2022**. Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase activity is unchanged despite increased myofilament calcium sensitivity in Zucker type 2 diabetic fatty rat heart. *Sci Rep*, 12, 16904.
- Nichols, G. A., Gullion, C. M., Koro, C. E., Ephross, S. A. & Brown, J. B. **2004**. The incidence of congestive heart failure in type 2 diabetes: an update. *Diabetes Care*, 27, 1879-84.
- Obara, K., Noda, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. **2008**. Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, 13, 537-47.
- Ogihara, T. & Mirmira, R. G. **2010**. An islet in distress:  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*, 1, 123-33.
- Ohkuma, S., Moriyama, Y. & Takano, T. **1982**. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2758-62.
- Ottenheijm, C. A. & Granzier, H. **2010**. Lifting the nebula: novel insights into skeletal muscle contractility. *Physiology (Bethesda)*, 25, 304-10.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G. & Johansen, T. **2007**. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282, 24131-45.
- Pape, H., Kurtz, A., Silbernagl, S. & Doi:10.1055/B-002-46974, E. a. H. a. T. **2018**. Physiologie, 8. Auflage.
- Park, S. W., Goodpaster, B. H., Lee, J. S., Kuller, L. H., Boudreau, R., De Rekeneire, N., Harris, T. B., Kritchevsky, S., Tylavsky, F. A., Nevitt, M., Cho, Y. W. & Newman, A. B. **2009**. Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32, 1993-7.
- Park, S. W., Goodpaster, B. H., Strotmeyer, E. S., De Rekeneire, N., Harris, T. B., Schwartz, A. V., Tylavsky, F. A. & Newman, A. B. **2006**. Decreased muscle strength and quality in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes*, 55, 1813-8.
- Park, S. W., Goodpaster, B. H., Strotmeyer, E. S., Kuller, L. H., Broudeau, R., Kammerer, C., De Rekeneire, N., Harris, T. B., Schwartz, A. V., Tylavsky, F. A., Cho, Y. W. & Newman, A. B. **2007**. Accelerated loss of skeletal muscle strength in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes Care*, 30, 1507-12.

- Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. **2014**. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- Peters, J. M., Franke, W. W. & Kleinschmidt, J. A. **1994**. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, 269, 7709-18.
- Pizon, V., Iakovenko, A., Van Der Ven, P. F., Kelly, R., Fatu, C., Fürst, D. O., Karsenti, E. & Gautel, M. **2002**. Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci*, 115, 4469-82.
- Prado, L. G., Makarenko, I., Andresen, C., Krüger, M., Opitz, C. A. & Linke, W. A. **2005**. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol*, 126, 461-80.
- Pühler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Müller, S., Engel, A., Hegerl, R. & Baumeister, W. **1992**. Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *Embo j*, 11, 1607-16.
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C. & Henquin, J. C. **2008**. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 10 Suppl 4, 32-42.
- Raskin, A., Lange, S., Banares, K., Lyon, R. C., Zieseniss, A., Lee, L. K., Yamazaki, K. G., Granzier, H. L., Gregorio, C. C., Mcculloch, A. D., Omens, J. H. & Sheikh, F. **2012**. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem*, 287, 29273-84.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. **2010**. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*, 12, 747-57.
- Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y. & Ouali, A. **2005**. Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *Febs j*, 272, 2578-90.
- Riehle, C. & Abel, E. D. **2016**. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res*, 118, 1151-69.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. & Goldberg, A. L. **1994**. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78, 761-71.
- Rodríguez-Reyes, N., Rodríguez-Zayas, A. E., Javadov, S. & Frontera, W. R. **2016**. Single muscle fiber contractile properties in diabetic RAT muscle. *Muscle Nerve*, 53, 958-64.
- Rossi, E., Faiella, A., Zeviani, M., Labeit, S., Florida, G., Brunelli, S., Cammarata, M., Boncinelli, E. & Zuffardi, O. **1994**. Order of six loci at 2q24-q31 and orientation of the HOXD locus. *Genomics*, 24, 34-40.
- Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M. & Cacicedo, J. M. **2013**. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 123, 2764-72.

- Saha, A. K., Avilucea, P. R., Ye, J. M., Assifi, M. M., Kraegen, E. W. & Ruderman, N. B. **2004**. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 580-5.
- Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. **2001**. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- Sandri, M. **2008**. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*, 23, 160-70.
- Sarma, S., Mentz, R. J., Kwasny, M. J., Fought, A. J., Huffman, M., Subacius, H., Nodari, S., Konstam, M., Swedberg, K., Maggioni, A. P., Zannad, F., Bonow, R. O. & Gheorghade, M. **2013**. Association between diabetes mellitus and post-discharge outcomes in patients hospitalized with heart failure: findings from the EVEREST trial. *Eur J Heart Fail*, 15, 194-202.
- Schauer, A., Draskowski, R., Jannasch, A., Kirchhoff, V., Goto, K., Männel, A., Barthel, P., Augstein, A., Winzer, E., Tugtekin, M., Labeit, S., Linke, A. & Adams, V. **2020**. ZSF1 rat as animal model for HFpEF: Development of reduced diastolic function and skeletal muscle dysfunction. *ESC Heart Fail*, 7, 2123-2134.
- Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Geetha, T., Wong, H. C., Krishna, N. R. & Wooten, M. W. **2004**. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*, 24, 8055-68.
- Seibenhener, M. L., Geetha, T. & Wooten, M. W. **2007**. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett*, 581, 175-9.
- Shimizu, I., Minamino, T., Toko, H., Okada, S., Ikeda, H., Yasuda, N., Tateno, K., Moriya, J., Yokoyama, M., Nojima, A., Koh, G. Y., Akazawa, H., Shiojima, I., Kahn, C. R., Abel, E. D. & Komuro, I. **2010**. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest*, 120, 1506-14.
- Shulman, G. I., Rothman, D. L., Jue, T., Stein, P., DeFronzo, R. A. & Shulman, R. G. **1990**. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med*, 322, 223-8.
- Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C. & Holman, R. R. **2000**. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj*, 321, 405-12.
- Szoke, E. & Gerich, J. E. **2005**. Role of impaired insulin secretion and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Compr Ther*, 31, 106-12.
- Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T. E., Kester, M., Loughran, T. P. & Wang, H. G. **2011**. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*, 7, 61-73.
- Thrainsdottir, I. S., Aspelund, T., Thorgeirsson, G., Gudnason, V., Hardarson, T., Malmberg, K., Sigurdsson, G. & Rydén, L. **2005**. The association between glucose abnormalities and heart failure in the population-based Reykjavik study. *Diabetes Care*, 28, 612-6.

- Tskhovrebova, L. & Trinick, J. **2004**. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*, 279, 46351-4.
- Tsukamoto, O., Minamino, T., Okada, K., Shintani, Y., Takashima, S., Kato, H., Liao, Y., Okazaki, H., Asai, M., Hirata, A., Fujita, M., Asano, Y., Yamazaki, S., Asanuma, H., Hori, M. & Kitakaze, M. **2006**. Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 340, 1125-33.
- Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S. & Kampinga, H. H. **2008**. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry*, 47, 7001-11.
- Wang, K., Mccarter, R., Wright, J., Beverly, J. & Ramirez-Mitchell, R. **1993**. Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophys J*, 64, 1161-77.
- Wang, K., McClure, J. & Tu, A. **1979**. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3698-702.
- Watada, H. & Fujitani, Y. **2015**. Minireview: Autophagy in pancreatic  $\beta$ -cells and its implication in diabetes. *Mol Endocrinol*, 29, 338-48.
- Waterlow, J. C., Garlick, P. J. & Millward, D. J. **1978**. *Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body*, North-Holland Publishing Company.
- Waters, S., Marchbank, K., Solomon, E., Whitehouse, C. & Gautel, M. **2009**. Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett*, 583, 1846-52.
- Wilkinson, C. R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. & Gordon, C. **2001**. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol*, 3, 939-43.
- Wing, S. S. & Goldberg, A. L. **1993**. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol*, 264, E668-76.
- Wooten, M. W., Geetha, T., Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Diaz-Meco, M. T. & Moscat, J. **2005**. The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem*, 280, 35625-9.
- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y. & Zhang, W. **2014**. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*, 11, 1185-200.
- Yamasaki, R., Wu, Y., Mcnabb, M., Greaser, M., Labeit, S. & Granzier, H. **2002**. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 90, 1181-8.
- Yang, Z. & Klionsky, D. J. **2010**. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 124-31.
- Ye, J. **2013**. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*, 7, 14-24.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

---

- Yorimitsu, T. & Klionsky, D. J. **2005**. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1542-52.
- Zhang, D., Wang, W., Sun, X., Xu, D., Wang, C., Zhang, Q., Wang, H., Luo, W., Chen, Y., Chen, H. & Liu, Z. **2016**. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy*, 12, 1447-59.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. & Moller, D. E. **2001**. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108, 1167-74.
- Zou, P., Pinotsis, N., Lange, S., Song, Y.-H., Popov, A., Mavridis, I., Mayans, O. M., Gautel, M. & Wilmanns, M. **2006**. Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature*, 439, 229-233.
- Zucker, L. M. & Zucker, T. F. **1961**. Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity*, 52, 275-278.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger aufrichtig bedanken. Sie gab mir die Möglichkeit, unter ihrer hervorragenden Betreuung diese spannende Arbeit durchzuführen. Ihre fachliche Expertise, inspirierende Anleitung sowie eine stets offene Tür waren für mich von unschätzbarem Wert. Ebenso möchte ich meiner Co-Betreuerin, Frau Prof. Dr. Maria Grandoch, für die Unterstützung während des gesamten Forschungsprojektes herzlich danken. Des Weiteren möchte ich mich bei Sabine Bongardt bedanken. Mit ihrer umfassenden Erfahrung, Geduld und fachlichen Kompetenz hat sie mir meine Einarbeitung erleichtert und so entscheidend zum erfolgreichen Verlauf meiner Forschung beigetragen. Ein weiteres Dankeschön gilt Herrn Dr. Sebastian Kötter für die zahlreichen, wertvollen Ratschläge sowie die persönlich und fachlich bereichernde Zusammenarbeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. David Monteiro Barbosa, der mir durch motivierende Gespräche und seine inspirierende Arbeitseinstellung stets neue Motivation gab. Dem SFB 1116 und seiner wissenschaftlichen Koordinatorin Frau Dr. Sandra Berger danke ich für die großzügige Finanzierung dieses Projektes. Außerdem möchte ich mich bei der Bayer AG in Wuppertal für die Kooperation und die Bereitstellung der Gewebeproben bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund und Kommilitonen Assil Taleh, der mir während des gesamten Studiums und während meiner Forschungsarbeiten zur Seite stand. Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre bedingungslose Unterstützung mein Studium ermöglicht haben. Vielen Dank an meinen Bruder, der mir stets ein Vorbild war und sein wird. Herzlichen Dank an meine Freundin, Annika Orlean, deren unermüdlicher Rückhalt mir während des gesamten Forschungsprozesses Kraft und Motivation verliehen hat.