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

Die Titin-basierte Skelettmuskelfunktion ist in einem Mausmodell mit *high-fat diet* und nach kardialer Ischämie/Reperfusion beeinträchtigt

Dissertation

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

> vorgelegt von Benedikt Johannes Wolframm

> > 2024

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Postervorstellung im Rahmen der Tagung der deutschen physiologischen Gesellschaft 2021 in Frankfurt a.M., Deutschland: Wolframm, B., Barbosa, D.M., Ding, Z., Wegener, K., Grandoch, M., Krüger, M., 2021, Titin-based skeletal muscle function is impaired in a mouse model with diet-induced obesity and after cardiac ischemia/reperfusion.

Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen in engem Zusammenhang mit Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes mellitus. Patienten mit Typ-2-Diabetes leiden häufig unter verminderter Muskelkraft und Atrophie der Skelettmuskulatur. Das Muskelfilamentprotein Titin trägt wesentlich zur Struktur und Elastizität des Sarkomers bei. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass kardiale Ischämie und Reperfusion (I/R) einen raschen Anstieg der Titin-basierten passiven Spannung der Myofilamente (passive tension, PT) bewirken, der durch die Phosphorylierung der PEVK-Region an S11878 und S12022 ausgelöst wird. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich ernährungsbedingte Adipositas mit Prädiabetes auf das Sarkomerprotein Titin und die Skelettmuskelfunktion nach kardialer Ischämie und Reperfusion auswirkt. Dazu wurden acht Wochen alte C57BL/6-Mäuse, die 10 Wochen lang mit einer fett- und zuckerreichen Diät (high-fat diet) gefüttert wurden, verwendet. Anschließend wurden die Tiere 45 Minuten lang einer chirurgischen Herzischämie unterzogen, gefolgt von einer dreiwöchigen Reperfusion. Die Skelettmuskeln M. Psoas, Tibialis anterior (TA) und Extensor digitorum longus (EDL) wurden entnommen und untersucht. Mittels Western-Blot Verfahren wurde die Titinphosphorylierung an den Serinresten S11878 und S12022, sowie die Phosphorylierung von PKCa bestimmt. Als Indikator für Proteinabbau wurde die Phosphorylierung von AMPK bestimmt. Das Titin-Isoform-Verhältnis wurde durch densitometrische Auswertung der Coomassie gefärbten Titin-Gele bestimmt. Zusätzlich wurden die passive Zugspannung durch stufenweise Dehnung der Faser als auch die maximale Ca²⁺-induzierte Kraft gemessen. Die Experimente zeigten, dass kardiale I/R einen signifikanten Einfluss auf die Kraftentwicklung im Skelettmuskel hat. Im M. Psoas und EDL der Kontrolltiere wurde gezeigt, dass I/R zu einer reduzierten passiven Spannung sowie zu einer reduzierten maximalen Kraft führt. High-fat diet hatte den gleichen Effekt auf die aktiven und passiven Kräfte im M. Psoas und im EDL. Im TA wurde durch I/R und high-fat diet eine erhöhte passive Spannung gemessen, die nicht mit der aktiven Kraft korrelierte. Im M. Psoas der high-fat diet-Mäuse korrelierte die verminderte Kraft mit einer Hypophosphorylierung von Titin an S12022. Die Aktivität der AMPK ist im TA durch I/R erhöht, im EDL durch I/R verringert und im M. Psoas in den high-fat diet-Mäusen durch I/R ebenfalls verringert. Somit zeigt sich eine diskordante Korrelation der AMPK-Phosphorylierung zu den Kraftmessungen. Zusammenfassend

lässt sich sagen, dass sowohl *high-fat diet* als auch kardiale I/R zu einer dynamischen muskelspezifischen Anpassung der Titin-basierten passiven Steifigkeit führen.

Summary

Cardiovascular diseases are closely linked to metabolic diseases such as diabetes mellitus. Patients with type 2 diabetes often suffer from reduced muscle strength and atrophy of the skeletal muscles. The muscle filament protein titin contributes significantly to the structure and elasticity of the sarcomere. Previous work has shown that cardiac ischaemia and reperfusion (I/R) induce a rapid increase in titin-based passive tension (PT) of myofilaments, which is triggered by phosphorylation of the PEVK region at S11878 and S12022. In the present study, the effects of diet-induced obesity with prediabetes on the sarcomere protein titin and skeletal muscle function after cardiac ischaemia and reperfusion were investigated. Eight-week-old C57BL/6 mice fed a high-fat diet for 10 weeks were used for this purpose. The animals were then undergoing 45 minutes of surgical cardiac ischaemia followed by three weeks of reperfusion. The skeletal muscles psoas muscle, tibialis anterior (TA) and extensor digitorum longus (EDL) were sampled and analysed. Titin phosphorylation at serine residues S11878 and S12022 and phosphorylation of PKCa were determined using Western blot methods. The phosphorylation of AMPK was determined as an indicator of protein degradation. The titin isoform ratio was determined by densitometric analysis of Coomassie-stained titin gels. In addition, the passive tension by stepwise stretching of the fibre as well as the maximum Ca2+-induced force were measured. The experiments showed that cardiac I/R has a significant influence on force development in skeletal muscle. In the psoas muscle and EDL of control animals, I/R was shown to lead to reduced passive tension as well as reduced maximal force. High-fat diet had the same effect on active and passive forces in the psoas muscle and EDL. In the TA, an increased passive tension was measured by I/R and high-fat diet, which did not correlate with the active force. In the psoas muscle of the high-fat diet mice, the reduced force correlated with hypophosphorylation of titin at S12022. The activity of AMPK is increased by I/R in the TA, decreased by I/R in the EDL, and decreased by I/R in the psoas muscle of the high-fat diet mice. Thus, there is a discordant correlation of AMPK phosphorylation to the strength measurements. In summary, both high-fat diet and cardiac I/R lead to a dynamic muscle-specific adaptation of titin-based passive stiffness.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Entität der diabetischen Kardiomyopathie2
Abb. 2: Drei proteolytische Systeme, die durch Krankheit oder Inaktivität zur
Muskelatrophie führen (aus (Jackman und Kandarian 2004)5
Abb. 3: Morphologische Organisation des Sarkomers, der kleinesten kontraktilen
Einheit der quergestreiften Muskulatur (modifiziert nach (Ottenheijm et al. 2011) 12
Abb. 4: Nomenklatur der elastischen I-Bandenregion des Skelettmuskels mit seiner
Isoform N2A (Prado et al. 2005)17
Abb. 5: Exemplarische Darstellung der Titin-Isoformen im Skelettmuskel von Mäusen
und im Herzmuskel von Ratten nach Färbung mit Imperial Protein Stain
Abb. 6: Schematische Darstellung der Fasermessapparatur MYOSCOPE System
(modifiziert nach van der Velden et al., 1998)
Abb. 7: Passive Zugspannung unter stufenweise Dehnung am Beispiel einer
Muskelfaser des M. tibialis anterior
Abb. 8: Passive Zugspannung und maximale Ca ²⁺⁻ induzierte Kraftentwicklung im M.
Psoas
Abb. 9: Relative Titin-Phosphorylierung an den Serienresten 12022 und 11878 der
PEVK-Domäne im M. Psoas
Abb. 10: Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα und AMPK im M. Psoas 41
Abb. 11: Titin Isoformverhältnis des full-length Titin (T1) zum spezifischen
Abbauprodukt (T2) im M. Psoas
Abb. 12: Passive Zugspannung und maximale Ca ²⁺⁻ induzierte Kraftentwicklung im M.
tibialis anterior
Abb. 13: Relative Titin-Phosphorylierung an den Serienresten S12022 und S11878 der
PEVK-Domäne im M. tibialis anterior
Abb. 14: Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα und AMPK im M. tibialis
anterior
Abb. 15: Titin Isoformverhältnis des full-length Titin (T1) zum spezifischen
Abbauprodukt (T2) im M. tibialis anterior
Abb. 16:Passive Zugspannung und maximale Ca ²⁺⁻ induzierte Kraftentwicklung im M.
extensor digitorum longus49
Abb. 17: Relative Titin-Phosphorylierung an den Serienresten 12022 und 11878 der
PEVK-Domäne im M. Extensor digitorum longus50

Abb. 18: Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα und AMPK im M. extensor	
digitorum longus	. 51
Abb. 19: Titin Isoformverhältnis des full-length Titin (T1) zum spezifischen	
Abbauprodukt (T2) im M. extensor digitorum longus	. 52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Fasertypen für den jeweiligen Muskel14
Tabelle 2: Fasertypen mit MHC-Isoform und funktioneller Klassifizierung
Tabelle 3: Puffer und Lösungen
Tabelle 4: Chemikalien
Tabelle 5: Lösungen für die Kraftmessung24
Tabelle 6: Laborgeräte
Tabelle 7: Antikörper
Tabelle 8: Software 27
Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS-Standardgel
Tabelle 10: Zusammensetzung SDS-Titingel
Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus Kraftmessungen und
biochemischen Untersuchungen der drei Muskeln M. Psoas, TA und EDL53
Tabelle 12: Tabellarische Übersicht der Veränderungen von passiver Spannung (PT)
und maximaler Ca ²⁺⁻ abhängiger Kraftentwicklung (Fmax) im Vergleich zu Tieren unter
Standarddiät und ohne I/R. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den drei Muskeln M.
Psoas, TA und EDL
Tabelle 13: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den biochemischen
Untersuchungen der drei Muskeln M. Psoas, TA und EDL61
Tabelle 14: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den biochemischen
Untersuchungen der drei Muskeln M. Psoas, TA und EDL62

Abkürzungsverzeichnis

Α	Ampere	
A-Band	Anisotropes Band	
Abb.	Abbildung	
ADP	Adenosindiphosphat	
AMP	Adenosinmonophosphat	
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase	
APS	Ammoniumpersulfat	
ATP	Adenosintriphosphat	
BSA	Bovine Serum Albumine	
CVD	Cardiovascular disease	
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	
D	Tag	
Da	Dalton	
DCM	Diabetische Kardiomyopathie	
DTT	Dithiothreitol	
EDL	Musculus extensor digitorum longus	
et al.	Et alii (und andere)	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	
HCL	Salzsäure	
HFD	High-fat diet	
IL	Interleukin	
Ig	Immunoglobulin	
L	Liter	
μ	mikro	
m	mili	
Μ	Molar/Mol	
М.	Musculus	
M-Bande	mittlere Bande	
MDa	Mega-Dalton	
MW	molecular weight	

NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Ν	Newton
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PEVK	Prolin, Glutamat, Valin, Lysin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
RT	Raumtemperatur
S	Sekunden
S	Serinrest
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
Ser	Serin
ТА	Musculus tibialis anterior
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendamin (TEMED)
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
us	unique sequence
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Klassifizierung und Pathophysiologie	1
1.1.2 Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen	2
1.1.3 Diabetes und Muskelgewebe	3
1.1.4 Diabetes induziert Atrophie und Kraftminderung im Skelettmuskel	4
1.2 Myokardinfarkt	5
1.2.1 Ätiologie und Pathophysiologie des Myokardinfarktes	5
1.2.2 Die Auswirkungen von Ischämie- und Reperfusionsschäden auf die	
Skelettmuskulatur	6
1.3 Skelettmuskulatur	7
1.3.1 Struktur der Skelett- und Herzmuskulatur	7
1.3.2 Morphologische Organisation des Sarkomers	8
1.3.3 Die Kontraktion der Skelettmuskulatur	9
1.3.4 Elektromechanische Kopplung: Molekulare Grundlage der Kontraktion in	
quergestreifter Skelettmuskulatur	10
1.3.5 Fasertypen der Skelettmuskulatur und MHC-Isoformverteilung	12
1.4 Titin	16
1.4.1 Titinstruktur	16
1.4.2 Veränderung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im Herz- und Skelettr	nuskel
durch posttranslationale Modifikation und Isoformen-Wechsel	18
1.5 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	
2.1.1 Biologisches Material/ Gewebeproben	
2.1.2 Puffer und Lösungen	21
2.1.3 Chemikalien	
2.1.4 Lösungen für die Kraftmessung	
2.1.5 Laborgeräte	
2.1.6 Antikörper	
2.1.7 Software	
2.2 Methoden	
2.2.1 Verwendete Proben	27

2.2.2 Biochemische Methoden	28
2.2.3. Kraftmessung an gehäuteten Skelettmuskelfasern	34
2.2.4 Statistische Datenanalyse	37
3 Ergebnisse	37
3.1 Analyse der passiven Spannung und der maximalen Kraftentwicklung im M. Psoas	38
3.2 Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung im M. Psoas	39
3.2.1 HFD-vermittelte Hypophosphorylierung von Titin an S12022	39
3.2.2 Verringerte Phosphorylierung der Kinase AMPK durch kardiale I/R in den HFD-	
Mäusen	40
3.2.3 High-fat diet und Ischämie und Reperfusion führen zu keiner signifikanten	
Veränderung des T2/T1-Verhältnisses	42
3.3 Analyse der passiven Spannung und der maximalen Kraftentwicklung im M. tibialis	
anterior	43
3.4 Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung im M. tibialis anterior	44
3.4.1 Unveränderte Phosphorylierung von Titin an S12022 und S11878 im M. tibialis	
anterior	44
3.4.2 Verstärkte Phosphorylierung der Kinase AMPK durch I/R in den SD- und HFD-	
Mäusen	45
3.4.3 Kardiale I/R führt zu einer verringerten Degradation in HFD-Mäusen	47
3.5 Analyse der passiven Spannung und der maximalen Kraftentwicklung im M. extenso	r
digitorum longus	48
3.6 Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung im M. extensor digitorum longus	49
3.6.1 I/R- und HFD-vermittelte Erhöhung der Phosphorylierung am Serinrest 11878 o	ler
PEVK-Region	49
3.6.2 Unveränderte Phosphorylierungslevel im EDL durch PKCα	50
3.6.3 Unverändertes T2/T1-Verhältnis durch den Einfluss von high-fat diet und I/R	51
4 Diskussion	53
4.1 Der Einfluss von high-fat diet auf die kontraktile Funktion der Skelettmuskulatur	53
4.2 Der Einfluss von kardialer I/R auf die kontraktile Funktion der Skelettmuskulatur	56
4.3 Posttranslationale Modifikationen von Titin in high-fat diet Mäusen und Mäusen mi	t
kardialer I/R	58
4.4 Titindegradation durch HFD und kardialer I/R	61
4.5 Limitationen	64
4.6 Schlussfolgerung	65

Literaturverzeichnis68

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Klassifizierung und Pathophysiologie

Neben genetischen Faktoren sind eine ungesunde Ernährungsweise und ein steigender Bewegungsmangel in der Gesellschaft wesentliche Einflussfaktoren für die weltweit steigende Prävalenz von Diabeteserkrankten. Schätzungen der International Diabetes Federation (IDF) zufolge sind im Jahr 2015 415 Millionen Erwachsene an Diabetes mellitus erkrankt, und für das Jahr 2040 wird eine Prävalenz von 642 Millionen vorhergesagt (Zheng et al. 2018). Diabetes mellitus (DM) lässt sich in einen Typ 1 und einen Typ 2 unterteilen. Beim Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich um eine chronisch autoimmune Form, charakterisiert durch eine mononukleäre Zellinfiltration in die pankreatischen Langerhans Inseln, verbunden mit einer Zerstörung der Insulin produzierenden ß-Zellen (Foulis et al. 1986). Die deutlich häufigere Form ist der Diabetes mellitus Typ 2, mit einem Anteil von über 90% aller an Diabetes Erkrankten (Zheng et al. 2018). Typ 2 Diabetes lässt sich im Wesentlichen durch vier metabolische Faktoren kennzeichnen. Zu den vier Merkmalen gehören Fettleibigkeit, gestörte Insulinwirkung, erhöhte endogene Glukoseausschüttung und eine sekretorische Dysfunktion der Insulinausschüttung (Weyer et al. 1999). Bevor ein manifester Diabetes entwickelt wird, durchlaufen die meisten Menschen eine Phase mit eingeschränkter Glukosetoleranz, (impaired glucose tolerance (IGT)), oder beeinträchtigten nüchtern Glukosewerten, (impaired fasting Glucose (IFT)). Diese Phase wird als Prädiabetes bezeichnet (Buysschaert und Bergman 2011). Prädiabetes wird als wesentlicher Risikofaktor für die spätere Ausbildung des Vollbilds Diabetes mellitus angesehen (Edwards und Cusi 2016). Aktuellen Schätzungen zufolge bilden Personen mit Prädiabetes in bis zu 70% aller Fälle einen späteren Diabetes mellitus aus (Nathan et al. 2007). Sowohl in hoch entwickelten Ländern als auch in Entwicklungsländern steigt die Zahl an Prädiabetes Erkrankten rasant an. Die IDF gibt für das Jahr 2011 Schätzungen an, nach denen 280 Millionen Menschen weltweit an Prädiabetes erkrankt sind und mit 398 Millionen Erkrankten im Jahr 2030 gerechnet wird (Aguiree et al. 2013). Prädiabetes, als Zwischenstufe von normalen Blutglukosewerten und der Ausbildung des DM, ist gekennzeichnet durch Stoffwechselanomalien mit peripherer Insulinresistenz und eingeschränkter ßZellfunktion. Weiterhin ist der Prädiabetes stark assoziiert mit dem metabolischen Syndrom (Grundy 2012) und damit einhergehend mit einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Huang et al. 2016).

1.1.2 Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen

Eine starke Korrelation zwischen der Stoffwechselerkrankung Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen (cardiovascular disease, CVD) wurde schon vor mehr als 40 Jahren durch die Framingham Studie belegt. Daraus geht hervor, dass Männer mit Diabetes eine 2,4-fach höhere Inzidenz für CVD haben, Frauen mit Diabetes erkranken sogar 5-fach häufiger an CVD (Kannel et al. 1974). Thrainsdottir et al. stellten ähnliche Korrelationen zu CVD auch bei Prädiabetes her (Thrainsdottir et al. 2005). Die Mechanismen, die zu diabetes-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen führen, sind vielfältig und komplex (Abb. 1.1). Adipositas, Prädiabetes, und Diabetes schaffen ein metabolisches Milieu, welches gekennzeichnet ist durch Hyperglykämie, erhöhte Fettsäuren und Triacylglyceride, sowie eine Hyperinsulinämie (Bugger und Abel 2014). Zusätzlich führen inflammatorische Zytokine im Myokard zu einer gestörten Funktion mit beeinträchtigter Relaxation und Kontraktion sowie verringerter Dehnbarkeit (Marwick et al. 2018). Abbildung 1 stellt diese Pathologien anschaulich zusammen.





Die glykämischen Effekte, einschließlich gestörtem Glukosetransport und Insulinresistenz, tragen zu einer Vielzahl an systemischen Effekten, sowie zu Veränderungen der Kardiomyozyten Funktion bei. Dazu gehören Störungen in der Glukose- und Fettsäureverwertung, Störungen in der mitochondrialen Funktion sowie Störungen im Kontraktionsvorgang. Autonome Dysfunktion, oxidativer Stress mit seinen Folgen sind weitere systemische Effekte, die Auswirkungen auf den Herzmuskel und die Kardiomyozyten haben (Marwick et al. 2018).

1.1.3 Diabetes und Muskelgewebe

Den größten Teil der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme leistet der Skelettmuskel, und somit erfüllt dieser einen wesentlichen Anteil am Kohlenhydratstoffwechsel. Gesteigerte Glykolyse, bedingt durch gesteigerte Hexokinase und 6-Phosphofructokinase Aktivität zum einen und Stimulation der Glykogen Synthese zum anderen, sind die Stellschrauben für die physiologischen Auswirkungen von Glukose und Insulin auf die Skelettmuskulatur. diabetischen Im Skelettmuskel hingegen ist der Kohlenhydratstoffwechsel beeinträchtigt. Warram et. al. fanden heraus, dass schon Jahre bevor es zu einer ß-Zell Zerstörung in den Langerhanschen Inseln kommt, zunächst die Insulinresistenz im peripheren Gewebe, allen voran in der Skelettmuskulatur, der maßgebliche Faktor für die spätere Destruktion der ß-Zellen ist (Warram et al. 1990).

Neben der beeinträchtigten Insulinresistenz sind der Kohlenhydratstoffwechsel und die Energiegewinnung im Skelettmuskel eingeschränkt. Hauptort der Energiegewinnung sind die Mitochondrien. Über eine Elektronentransportkette werden zuvor gewonnene Reduktionsäquivalente und ihre Reaktion zu H₂O hin genutzt, um die freiwerdende Energie für die dortige ATP-Synthase zu verwenden. Dieser Prozess wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Sowohl Übergewicht als auch DM Typ 2 führen zu einer Störung in der Elektronentransportkette subsarkolemmaler Mitochondrien und damit zu einer beeinträchtigen Energiegewinnung im Skelettmuskel (Ritov et al. 2005). Eine weitere Folge eingeschränkter Glukosetoleranz und Insulinresistenz ist, wie Abbildung 1.1 aufgezeigt, der oxidative Stress und dessen Beteiligung an der mitochondrialen Dysfunktion (Marwick et al. 2018). Histologische Analysen zeigen auf, dass eine durch Hochfett-Diät (*high fat diet*, HFD) induzierte Insulinresistenz in Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Bereiche subsarkolemmaler und intermyofibrillärer Mitochondrien im Skelettmuskel führt (Yokota et al. 2009).

Neben den negativen Auswirkungen auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben die mit Diabetes assoziierten metabolischen Dysfunktionen auch Auswirkungen auf das Skelettmuskelgewebe (Biolo et al. 2014).

1.1.4 Diabetes induziert Atrophie und Kraftminderung im Skelettmuskel

Skelettmuskelatrophie entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen kontraktiler Proteinsynthese und Proteinabbau, die durch eine Reihe von Faktoren wie muskulärer Inaktivität, Denervierung, Alterung sowie chronischen Krankheiten wie Diabetes mellitus zustande kommen. Charakterisiert ist Skelettmuskelatrophie dann durch eine Abnahme des Proteingehalts, des Faserdurchmessers, der Kraftproduktion und einer schnelleren Ermüdbarkeit (Jackman und Kandarian 2004). Abhängig von den auslösenden Faktoren werden Signalwege und molekulare Trigger initiiert, die in der Folge zu einer Skelettmuskelatrophie führen.

Das sind unter anderem Glukokortikoide, welche die Proteinsynthese verringern und den Abbau erhöhen (Tomas et al. 1979), Transkriptionsfaktoren wie der nuclear factor kB (NF-κB), Zytokine wie der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) (Li und Reid 2000), sowie oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (Gomes-Marcondes und Tisdale 2002). Darüber hinaus sind drei wichtige proteolytische Systeme zu nennen, die eine wesentliche Rolle beim Proteinabbau in der Skelettmuskulatur spielen. Das ist zum einen das Ubiquitin-Proteasom-System, welches einen großen Anteil an der Proteolyse einnimmt (Attaix und Taillandier 1998). Um die entsprechenden Substrate zu ubiquitinieren, kooperieren die Enzyme, die als E1- (Ubiquitin-aktivierende), E2-(Ubiquitin-konjugierende) und E3- (Ubiquitin-ligierende) Enzyme bezeichnet werden, in einem dreistufigen Kaskadenmechanismus miteinander (Glickman und Ciechanover 2002). Da das Ubiquitin-Proteasom-System keine intakten Myofibrillen spalten kann (Solomon et al. 1998), wird Calpain als Mitspieler genutzt. Die Protease Calpain spaltet myofibrilläre Proteine wie Titin und Nebulin und ermöglicht so ihre Erreichbarkeit für Ubiqutinligasen (Sorimachi et al. 2000). Ähnlich wie Calpain mit dem Ubiqitin-Proteasom-System zusammenarbeitet, so wirken auch das lysosomale und das Ubiqutitin-Proteasom-System zusammen, um spezifische Proteine abzubauen (Hicke 1999).



Abb. 2: Drei proteolytische Systeme, die durch Krankheit oder Inaktivität zur Muskelatrophie führen (aus (Jackman und Kandarian 2004).

Zu den drei proteolytischen Systemen gehören das calciumabhängige Calpain-System (A), das lysosomale Protease-System (B) und das Ubiquitin-Proteasom-System (C). Durch das interaktive Zusammenspiel der drei proteolytischen Systeme, können Myofibrillen gespalten und spezifische Proteine abgebaut werden. Dies führt in der Folge zu Muskelatrophie.

1.2 Myokardinfarkt

1.2.1 Ätiologie und Pathophysiologie des Myokardinfarktes

Ischämische Herzkrankheiten gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Der Myokardinfarkt ist definiert als ein plötzliches ischämisches Ereignis mit der Folge der Myokardnekrose (Jaffe 2013). Im klinischen Kontext wird der Myokardinfarkt meistens auf einen thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes zurückgeführt, der durch die Ruptur einer vulnerablen atherosklerotischen Plaque ausgelöst wird. Myokardiale Ischämie führt zu erheblichen metabolischen und ionischen Störungen im betroffenen Myokard. Für die Apoptose und Nekrose im infarzierten Herzmuskel sind hauptsächlich mitochondriale Veränderungen verantwortlich (Frangogiannis 2015).

Im humanen Herzmuskel kann es Stunden dauern, bis die Nekrose der Myozyten in der post-mortem Analyse festgestellt werden kann. Im Tiermodell hingegen kann bereits 10 Minuten nach induzierter Myokardischämie ein biochemischer Nachweis der Myokardnekrose durch Apoptose erbracht werden (Ooi et al. 2000). Die Infarktheilung ist abhängig von einer Entzündungskaskade, die wiederum von apoptotischen Zellen ausgelöst wird. Infiltrierende Phagozyten beseitigen die apoptotischen Zellen; damit werden entzündungshemmende Signalwege aktiviert und Zytokin- und Chemokinsignale werden unterdrückt. Dennoch führt die Infarktheilung zu einem geometrischen Umbau der Kammer, gekennzeichnet durch Dilatation, Hypertrophie und fortschreitende Funktionsstörung.

1.2.2 Die Auswirkungen von Ischämie- und Reperfusionsschäden auf die Skelettmuskulatur

Ein Myokardinfarkt und auch Ischämie- und Reperfusionsschäden können im weiteren Verlauf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen verstärken. Wird ein Gewebe in eine temporäre Ischämie versetzt und im Anschluss reperfundiert, führen diese Umstände zu einer Schädigung des Gewebes. Der Pathomechanismus eines Ischämie- und Reperfusionsschadens ist ähnlich der eines reperfundierten Myokardinfarkts und eignet sich daher als Infarktmodell in der hier vorliegenden Arbeit. Im betroffenen Myokard führt die Ischämie- und Reperfusionsphase aufgrund von physiologischen, biochemischen und immunologischen Veränderungen zu einer lokalen und systemischen Entzündungsreaktion (Gillani et al. 2012). Eine im Skelettmuskel herbeigeführte Ischämie führt zu einer fortschreitenden Verringerung der intrazellulären Energiespeicher. Trotz der Pufferwirkung von Kreatinphosphat werden die ATP-Speicher konsekutiv verbraucht. Zu dem fortschreitenden Verlust von ATP werden zusätzlich Glykogenspeicher geleert, was zu einer geringeren Energieproduktion und Laktatakkumulation führt (Walker 1991). Die anschließende Reperfusion im Skelettmuskel führt zu einer reaktiven Hyperämie, wodurch die Muskeldurchblutung gesteigert und exogene Substrate sowie Sauerstoff zugeführt werden. Andererseits werden durch den gesteigerten Blutfluss Vorstufen für die Resynthese von ADP ausgespült und es werden freie Sauerstoffradikale gebildet mit der Folge der Lipidperoxidation der Zellmembran (Walker 1991). Darüber hinaus führt die Reoxygenierung zu einem Kalziumeinstrom, der die oxidative Rephosphorylierung in den Mitochondrien unterbricht (Walker 1991).

Im Rahmen der metabolischen Veränderungen, die durch Ischämie- und Reperfusionsschäden in der Skelettmuskulatur ausgelöst werden, ist die Funktionalität der Skelettmuskulatur ebenfalls stark beeinträchtigt (Rácz et al. 1996). Carvalho et al. zeigten eine verringerte passive Spannung in der Skelettmuskulatur nach Ischämie und Reperfusion (Carvalho et al. 1997). Die Stärke der Beeinträchtigung der kontraktilen Leistung unterscheidet sich jedoch hinsichtlich der jeweiligen Fasertyp-Komposition. Langsam-zuckende oxidative Muskeln waren weniger stark beeinträchtigt als schnellzuckende glykolytische Muskeln (Carvalho et al. 1997).

Wie sich jedoch der Metabolismus und die kontraktile Leistung der Skelettmuskulatur nach kardialer Ischämie verändert, ist bisher wenig erforscht. Wichtige Erkenntnisse liefern Untersuchungen der Skelettmuskelfunktion bei chronischer Herzinsuffizienz. Drexler et al. fanden heraus, dass die Volumendichte der Mitochondrien und damit die oxidative Kapazität der Skelettmuskulatur bei chronischer Herzinsuffizienz abnimmt. Damit einhergehend wurde eine Verschiebung der Faserverteilung zu Gunsten der glykolytischen Typ IIB Fasern festgestellt (Drexler et al. 1992).

1.3 Skelettmuskulatur

1.3.1 Struktur der Skelett- und Herzmuskulatur

Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur sind zwar ähnlich aufgebaut, zeigen jedoch in einigen Bereichen wesentliche Unterschiede. So besteht der Skelettmuskel morphologisch aus vielkernigen Muskelfasern, die mehrere Zentimeter lang sein können und einen Durchmesser von 10-100 µm aufweisen. Auch wenn die Zellkerne der Muskelfaser nicht mehr teilungsfähig sind, so können bei Verletzung oder Wachstum zusätzliche Zellkerne von teilungsfähigen Satellitenzellen geliefert werden. Diese Möglichkeit der Selbstheilung besitzt die Herzmuskelzelle nicht. Sie ist circa 100 µm lang, hat einen Durchmesser von circa 15 µm und ist durch einen einzelnen zentralen aufgebaut. Kern Zudem verfügt die Herzmuskulatur über ein eigenes Erregungsleitungssystem und lässt sich nicht willkürlich ansteuern. Das Erregungsleitungssystem des Herzens ist ein autonomes System, welches durch eine schnelle spontane Depolarisation ein elektrisches Signal (Aktionspotenzial) generiert. Das elektrische Signal wird auf das Myokard übertragen und löst eine Kontraktion aus. Der Mechanismus aus elektrischem Signal, welches in einer Kontraktion mündet, wird elektromechanische Kopplung genannt. Ausgangspunkt der Erregungsbildung ist der Sinusknoten. Über diesen breitet sich die Erregung auf den Atrioventrikularknoten, das His-Bündel und die Tawara-Schenkel aus und erreicht schlussendlich die Endaufzweigungen der Tawaraschenkel. die Purkinje-Fasern in der Herzkammermuskulatur. Die Erregungsübertragung zwischen zwei Herzmuskelzellen wird über Gap-Junctions gewährleistet. Gap-Junctions sind kommunizierende Verbindungen zwischen zwei Herzmuskelzellen und ermöglichen die fächerförmige Erregungsausbreitung.

Im Skelettmuskel kann eine Kontraktion willkürlich oder reflektorisch ausgelöst werden. Wird ein Aktionspotenzial im Motoneuron ausgelöst, wird das elektrische Signal über die motorische Nervenfaser zur neuromuskulären Endplatte weitergeleitet und auf die Muskelfaser übertragen. An der neuromuskulären Endplatte verzweigt sich der Fortsatz der Nervenzellen mehrfach in präsynaptische Endknöpfchen. Durch die multiple Aufzweigung der Nervenzelle können mehrere Muskelfasern erfasst werden und bilden damit eine motorische Einheit (Pape et al. 2018; Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

1.3.2 Morphologische Organisation des Sarkomers

Der kontraktile Baustein der Skelett- und Herzmuskelzelle ist das Sarkomer. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Länge eines Sarkomers bei 2,2 bis 2,4 μ m. Zahlreiche in Serie angeordnete Sarkomere bilden die Myofibrillen, die sich als dicht gepackte Bündel zu einer Muskelfaser zusammenschließen. Unter einem Lichtmikroskop betrachtet ist die Skelett- und Herzmuskulatur quergestreift. Der Grund für die Querstreifung ist die regelmäßige Anordnung der drei Myofilamente. Dazu gehören das dicke Filament Myosin, das dünne Filament Aktin und das Titinfilament. Morphologisch gesehen lässt sich die Anordnung weiter einteilen in eine Z-Scheibe, eine I- und A-Bande, eine H-Zone und die M-Linie. Der Abschnitt zwischen zwei benachbarten Z-Scheiben wird als Sarkomer bezeichnet und liegt mittig in der I-Bande. Die I-Bande erscheint lichtmikroskopisch als helle Bande, da die dort befindlichen Aktinfilamente wenig doppelt lichtbrechend (isotrop) sind. Über die Interaktion des in der Z-Scheibe enthaltenen α -Aktinin, ist Aktin dort verankert. Zwischen zwei I-Banden liegt die A-Bande. Aufgrund der hohen Dichte parallel angeordneter Myosinfilamente, erscheint die A-Bande dunkler und verhält sich im polarisierten Licht stark doppelbrechend (anisotrop). Inmitten der A-Bande liegt die H-Zone mit zentraler M-Linie. Die M-Linie besteht zum großen Teil aus Myomesin und verbindet die dicken Myosinfilamente miteinander.

1.3.3 Die Kontraktion der Skelettmuskulatur

Bei der Kontraktion der Skelettmuskulatur kommt es zu einer Längenänderung des Muskels, ohne dass sich die Myofilamente Myosin und Aktin dabei selbst verkürzen. Huxley und Hanson stellten 1954 die Gleitfilamenttheorie vor und beschrieben ein Aneinander-Entlang Gleiten der Filamente (HUXLEY und HANSON 1954). Bei Längenänderung des Muskels kommt es zu einer Verkürzung oder Dehnung des Muskels. Verkürzt sich der Muskel, gleiten die Aktinfilamente entlang der Myosinfilamente. Die I-Bande wie auch die H-Zone verkürzen sich, die A-Bande hingegen, dessen Länge, die der Myosinfilamente entspricht, bleibt konstant. Dehnt sich der Muskel auf, so werden die Aktinfilamente aus den Gleitlagern der Myosinfilamente gezogen, und entsprechend erweitern sich die I-Bande und die H-Zone. Titin, welches sich über ein Halbsarkomer von M-Linie bis Z-Scheibe perlschnurartig erstreckt, wird bei Dehnung über die Gleichgewichtslänge hinaus gedehnt. Die I-Banden Region von Titin wird bei der Sarkomerbewegung entweder gedehnt oder gestaucht/verkürzt und agiert wie eine molekulare Feder. Bei Stauchung der molekularen Feder (Titin) während der Kontraktion entsteht eine Rückschlagkraft, die dafür sorgt, dass das Myosinfilament während der Entspannungsphase wieder in seine Ausgangsposition des Sarkomers zurückgeschoben wird (Granzier und Labeit 2002). Die molekulare Grundlage für die Kraftentwicklung bzw. die Filamentverschiebung liefert der Querbrückenzyklus. Hierbei handelt es sich um ein Zusammenspiel zwischen Myosinkopf und Aktinfilament, in dessen Prozess ATP hydrolysiert wird. In Ruhigstellung ist keine Interaktion der beiden Myofilamente möglich, da das Begleitprotein Tropomyosin die Bindungsstelle blockiert. Ein elektrischer oder chemischer Reiz erhöht durch Öffnung von Calciumkanälen im Sarkolemm und sarkoplasmatischen Retikulum die intrazelluläre Calciumkonzentration. Infolgedessen wird die Myosinbindungstelle am Myosinkopf enthemmt und ein ATP-Molekül kann an das aktive Zentrum des Myosinkopfes binden. Durch die Myosin-ATPase wird das ATP-Molekül in ADP und ein anorganisches Phosphat gespalten und der Myosinkopf ändert seine Konformation, sodass dieser an Aktin binden kann. Durch Dissoziation des anorganischen Phosphats aus dem aktiven Zentrum des Myosinkopfes zieht das Myosinfilament das Aktinfilament an sich entlang. Dieser Vorgang ist der erste Teil des sogenannten Kraftschlags und er bewirkt die erste Verkürzung des Sarkomers. Durch weitere Dissoziation des ADP wird eine weitere Verkürzung des Sarkomers bewirkt und der zweite Teil des Kraftschlags ist vollendet. Die Myofilamente haben sich nun 8-12 nm gegeneinander verschoben. Den Querbrückenzyklus durchläuft eine aktive Muskelfaser bis zu 5-50-mal pro Sekunde. Erfolgt auf einen elektrischen Reiz eine mechanische Kontraktion, so spricht man von elektromechanischer Kopplung (Pape et al. 2018).

1.3.4 Elektromechanische Kopplung: Molekulare Grundlage der Kontraktion in quergestreifter Skelettmuskulatur

Das Aktionspotenzial ist der elektrische Reiz, der die Kontraktion des Muskels einleitet, und wird durch Na⁺ und K⁺-Ionen reguliert. Die Öffnung schneller spannungsgesteuerter Na⁺-Kanäle führt zu einer schnellen Depolarisation und infolgedessen zu einer Inaktivierung der Na⁺-Kanäle mit Repolarisation und Öffnung von K⁺-Kanälen. Die Fortleitung des Aktionspotenzials bis in das Innere des Sarkomers erfolgt über T-Tubuli. Dabei handelt es sich um geflechtartige Röhren, die senkrecht zur Oberfläche der Muskelfaser verlaufen und in das Sarkolemm eingestülpt sind. Sie werden daher als transversales tubuläres System bezeichnet. Ein weiteres Netzwerk des Intrazellularraums ist das sarkoplasmatische Retikulum. Es verläuft mit der Faserrichtung der Myofibrille und ist eng verbunden mit den Röhren der T-Tubuli. In der geflechtartigen Struktur der T-Tubuli und des sarkoplasmatischen Retikulums befinden sich Ca²⁺⁻Kanäle, deren Calciumfreisetzung den Querbrückenzyklus und damit die Kontraktion der Muskulatur regulieren. Der spannungsgesteuerte Ca²⁺⁻Kanal, Dihydropyridinrezeptor, befindet sich in der Membran der T-Tubuli. In den Aussackungen des Röhrensystems des sarkoplasmatischen Retikulums befinden sich Ryanodinrezeptoren, die mit den Dihydropyridinrezeptoren mechanisch in Kontakt stehen. Der Ryanodinrezeptor ist ebenfalls ein Ca²⁺⁻Kanal und setzt bei Aktivierung Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol frei. Die enge Verbindung zwischen sarkoplasmatischem Retikulum und T-Tubulus wird durch die Anordnung der zwei Calciumkanäle zusätzlich unterstützt, sodass diese eine Verdichtung des Geflechts bewirken. Man spricht von sogenannten junctional feet, die sich elektronenmikroskopisch erkennen lassen (Protasi et al. 2000).

Initiator für die Calciumfreisetzung aus den Ca²⁺- Kanälen ist die Ausbreitung des Aktionspotenzials und damit einhergehend die Depolarisation der Membran der T-Tubuli. In der Folge kommt es zur reaktiven Öffnung des an den Dihydropyridinrezeptor gekoppelten Ryanodinrezeptors. Das gespeicherte Ca²⁺ aus den Aussackungen des sarkoplasmatischen Retikulums kann in das Sarkoplasma ausströmen und gelangt somit zu den Aktin- und Myosinfilamenten. An die Aktinfilamente angelagert sind die Regulatorproteine Troponin und Tropomyosin. Das Protein Troponin reguliert den Querbrückenzyklus und damit die Kontraktion der Skelettmuskulatur, indem erst bei hohen zytoplasmatischen Calciumkonzentrationen (>10⁻⁷ mol/l) eine Konformation der Untereinheit vom Troponin, die notwendigen Bindungsstellen freigibt. Daraus resultiert eine Bindung von Ca²⁺Ionen an die zusätzlichen Bindungsstellen des Troponins, welches daraufhin Tropomyosin umlagert (Pape et al. 2018). Die Umlagerung von Tropomyosin bewirkt eine hochaffine Interaktion zwischen den Aktinmonomeren und den Myosinköpfen, und der Querbrückenzyklus kann vollständig ablaufen (Vibert et al. 1997).



Abb. 3: Morphologische Organisation des Sarkomers, der kleinesten kontraktilen Einheit der quergestreiften Muskulatur (modifiziert nach (Ottenheijm et al. 2011)

Das Sarkomer ist aus drei Myofilamenten aufgebaut: den dünnen Aktinfilamenten, welche in der Z-Scheibe über α-Aktinin verankert sind, den dicken Myosinfilamenten, die in der M-Linie über Myomesin in Verbindung stehen und den fadenförmigen Titinfilamenten, die sich von der Z-Scheibe bis zur M-Linie aufspannen.

1.3.5 Fasertypen der Skelettmuskulatur und MHC-

Isoformverteilung

Um die Aufgaben der Skelettmuskulatur abzudecken, gibt es verschiedene Typen von Skelettmuskelfasern. Die Einteilung kann anhand der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Zeit bis zur Ermüdung unter wiederholter Stimulation getroffen werden. Die motorischen Einheiten der Skelettmuskelfasern können unterschieden werden in langsam zuckende oxidative Fasern (Typ I oder S, englisch *slow*), in schnell zuckende oxidativglykolytische Fasern (Typ IIA oder FR, englisch fatigue resistent) und schnell zuckende glykolytische Fasern (Typ IID/X oder FF, englisch fast fatigable) (Silverthorn 2009). Die Energiebereitstellung der Typ I Fasern erfolgt aerob durch oxidative Phosphorylierung. Daher besitzen Typ I Fasern neben zahlreichen Mitochondrien auch einen hohen Gehalt an Myoglobin, welches die Faser als Transportmolekül mit Sauerstoff versorgt. Durch den hohen Myoglobingehalt erscheint die Muskulatur rot. Die ATP-Bereitstellung der Typ IIA Faser ist abhängig von der Beanspruchung: aerob oder anaerob. Demnach wird die für die Kontraktion benötigte Energie sowohl über oxidative Phosphorylierung als auch über anaerobe Glykolyse bereitgestellt. Die schnell zuckende Typ IIX Faser ist größtenteils glykolytisch, besitzt wenig Mitochondrien und wenig Myoglobin und erscheint daher weiß. Die bei der anaeroben Glykolyse anfallenden H⁺-Ionen tragen zu Übersäuerung bei und erklären die schnellere Ermüdbarkeit (Silverthorn 2009). Durch Fortschritte der in Methodik histochemischer Färbung wurden weitere intermediäre/hybride Fasertypen entdeckt. Hybride Fasern haben mindestens zwei MHC-Isoformen. Identifiziert wurden anhand ihrer Myosin-ATPase Färbung die Fasertypen IC (MHCI und MHCIIa), IIC (MHCIIa und MHCI), IIAD (MHCIIa und MHCIId), IIDA (MHCIId und MHCIIa), IIDB (MHCIId und MHCIIb) und IIBD (MHCIIb und MHCIId) (Pette und Staron 2000). Die ATPase befindet sich an der schweren Kette des Myosinkopfes (MHC, myosin heavy chain) und damit lässt sich die Korrelation zwischen Fasertyp und MHC-Isoformprofil erklären (Fry et al. 1994). Ursprünglich wurden drei MHC-Isoformen (MHCI, MHCIIa und MHCIIb) entdeckt. In kleinen Säugetieren wurde jedoch eine vierte MHC-Isoform (MHCIIX oder MHCIId) identifiziert, die von ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen der MHCIIa und MHCIIb liegt (Scott et al. 2001). Da die MHC-Isoformen wesentlich zu den funktionellen Unterschieden der Fasertypen beitragen, lassen sich diese besonders gut als Marker für die Typisierung der Fasern heranziehen (Pette und Staron 2000). Demnach werden die Fasertypen in kleinen Säugetieren auch anhand ihrer MHC-Isoform bezeichnet; die langsame Typ I Faser mit MHCI und die drei schnellen Fasertypen Typ IIA mit MHCIIa, Typ IID/X mit MHC IId/IIx und Typ IIB mit MHCIIb (Pette und Staron 1990) (Schiaffino und Reggiani 1994). Gleichartige Skelettmuskel unterschiedlicher Spezies exprimieren unterschiedliche Fasertypen (Hämäläinen und Pette 1995), aber auch innerhalb einer Spezies unterscheidet sich die Verteilung der Fasertypen je nach Skelettmuskel (Delp und Duan 1996). In den hier durchgeführten Experimenten wurden Skelettmuskelfasern von C57BL/6J-Mäusen verwendet. Die untersuchten Skelettmuskeln waren M. Psoas, M. tibialis anterior und M. extensor digitorum longus (Abbildung 4, Tabelle 1).

Der M. Psoas gehört zur inneren Hüftmuskulatur. Er vereint sich mit dem M. iliacus zum M. iliopsoas und fungiert hauptsächlich als Hüftbeuger und dient der posturalen Stabilität (Penning 2000). Der M. Psoas ist ein dynamischer Muskel mit überwiegend schnellenzuckenden glykolytischen Typ IIB Fasern. Die genaue Faserverteilung des M. Psoas beschreibt Vlahovic et al. wie folgt: Typ I 6,7%, Typ IIA 24,3%, Typ IIB 47,7% und Typ IID/X mit 21,3% (Vlahovic et al. 2017). Der M. tibialis anterior gehört anatomisch zur vorderen Gruppe der Unterschenkelmuskulatur und ist funktionell den Extensoren zuzuordnen. Er stabilisiert das Sprunggelenk und unterstützt bei der Dorsalflexion/extension, Adduktion und Supination des Fußes. Der M. tibialis anterior von C57BL6J Mäusen zeigt eine Faserverteilung von 0,2% Typ I, 1,1% Typ IIA, 3,4% Typ IIAD, 2,3% Typ D, 33,8% Typ IIDB und 59,7% Typ IIB Fasern (Augusto et al. 2017). Damit lässt sich der TA eindeutig zu den schnell zuckenden, glykolytischen Muskeln zuordnen. In anatomischer Nachbarschaft befindet sich der M. extensor digitorum longus. Er unterstützt die Pronation des Fußes und bewirkt eine Beugung des oberen Sprunggelenks sowie eine Streckung der Zehen. Damit gehört der EDL ebenfalls zur Extensorengruppe der Unterschenkelmuskulatur. Er weist eine ähnliche Faserverteilung wie der TA auf: Typ I 0,4%, Typ IC 3,6%, Typ IIA 0,5%, Typ IIAD 7,6%, Typ IID 0,5%, Typ IIDB 21,5% und Typ IIB 66% (Augusto et al. 2017). Damit ist der EDL auch ein schnell zuckender Muskel mit glykolytischem Stoffwechsel (Tabelle 1 und 2). Unterschiede in den drei ausgewählten Muskeln zeigen sich somit zum einen hinsichtlich der topographischen Lage und zum anderen in der Funktion des jeweiligen Muskels. Zudem zeigt der M. Psoas mit fast einem Drittel oxidativer und oxidativ-glykolytischer Fasern einen anderen Muskelmetabolismus unter Standardbedingungen.

Muskel **Faserverteilung in %** Ι IC IIA IIAD IIB IID IIDB IID/X **Psoas** 6,7 -24.3 -47.7 _ 21.3 _ 0,2 1,1 TA 3,4 59,7 _ 2,3 33,8 EDL 0,4 3,6 0,5 7,6 66 0,5 33,3 21,5

 Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Fasertypen für den jeweiligen Muskel

 Muskel

 Fasertvorteilung in %



Abb. 4: Schematische Darstellung der untersuchten Muskelgruppen

Ventrale Ansicht auf das Knochenskelett einer Maus. Eingefügt wurden der Hüftbeuger M. Psoas und die Muskeln der Extensorenloge M. tibialis anterior und M. extensor digitorum longus.

Fasertyp	MHC-Isoform	Funktionelle Klassifizierung
Ι	Ι	ST, oxidativ
IC	I und IIa	Hybridfaser überwiegend ST
IIA	IIa	FR, oxidativ-glykolytisch
IIAD	IIa und IId	Hybridfaser überwiegend FR
IIB	IIb	FF, glykolytisch
IID	IId	FF, glykolytisch
IIDB	IId und IIb	Hybridfaser ausschließlich FF
IIDX	IId und IIx	FF, glykolytisch
Legende	•	Beschreibung
ST	Slow twitch	Langsam zuckende Faser
FR	Fatigue resistent	Schnell zuckende Faser
FF	Fast fatigable	Schnell zuckende Faser

Tabelle 2: Fasertypen mi	t MHC-Isoform und	funktioneller	Klassifizierung
--------------------------	-------------------	---------------	-----------------

1.4 Titin

1.4.1 Titinstruktur

Titin, auch als Connectin bekannt (Koscak MARUYAMA 1976), ist das größte bisher bekannte Protein in der quergestreiften Muskulatur von Säugetieren. Es bildet neben den Myofilamenten Aktin und Myosin, das Rückgrat des Sarkomers. Auf genomischer Ebene wird Titin, sowohl bei Menschen als auch bei der Maus, von einem einzigen Gen kodiert, welches sich auf dem langen Arm von Chromosom 2 befindet (Bang et al. 2001). Titin ist am NH₂-Terminus der Z-Scheibe verankert, verläuft bis zur M-Linie (COOH-Terminus) und überspannt somit ein Halbsarkomer. Im Skelettmuskel ist Titin über Nebulin und α -Aktinin in der Z2-Zis1-Domäne der Z-Scheibe verankert (Witt et al. 2006) (Labeit et al. 2006), im Herzmuskel durch die spezifische Isoform Nebulette (Moncman und Wang 1995). Titin exprimiert zwei unterschiedliche Varianten im Herzmuskel. Die längere und größere N2BA (3,2-3,8 MDa) und die kürzere N2B (3 MDa) (Trombitás et al. 2000). Im Skelettmuskel hingegen wird nur die Isoform N2A (3,3-3,7 MDa) exprimiert, die spezies- und muskelspezifisch durch alternatives Spleißen in zahlreichen Isoformen unterschiedlicher Länge vorliegen kann (Prado et al. 2005).

Das Titinfilament ist hauptsächlich durch eine serielle Anordnung von Immunglobulinähnlichen Domänen (*Ig-domains*), Fibronectin-type 3 Domänen und durch das Vorkommen so genannter unique sequences (us) gekennzeichnet (Bang et al. 2001). Der I-Bandenbereich von Titin setzt sich aus Sequenzen von proximalen Ig-Domänen, der N2A-Domäne mit ihrer N2A *unique sequence*, der PEVK Domäne und den distalen Ig-Domänen zusammen (siehe Abb. 4) (Linke et al. 1996). PEVK ist ein Akronym für die Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Valin (V) und Lysin (K), die in hoher Dichte in dieser Domäne vorkommen. Während die distale- und die Z-Scheibennahe Region der I-Bande konstitutiv exprimiert wird, unterliegen die proximale Ig-Domäne und die PEVK-Domäne der Regulation durch alternatives Spleißen. Da die I-Banden und besonders die PEVK-Region während der Dehnung heterogen erweitert werden, kann die I-Bande als molekulare Feder verstanden werden. Die angrenzende A-Bandenregion von Titin assoziiert an das Myosinfilament und ist daher funktionell steifer (Linke et al. 1996).



Abb. 4: Nomenklatur der elastischen I-Bandenregion des Skelettmuskels mit seiner Isoform N2A (Prado et al. 2005)

Titin spannt sich von der Z-Scheibe bis zur M-Linie über einem Halbsarkomer auf. Zwischen der Z-Scheibe und der steifen A-Bande befindet sich die I-Bande mit der skelettmuskelspezifischen Isoform N2A, der proximalen- und distalen Tandem Ig-Domäne und der PEVK-Region. Die proximale Tandem Ig-Domäne und die PEVK -Region variieren in ihrer Länge und werden durch alternatives Spleißen reguliert.

Aufgrund der zentralen Position im Sarkomer ist Titin in der Lage, Veränderungen der mechanischen Last wahrzunehmen, indem es mit mehr als 20 Proteinen interagiert, die mit entsprechenden Signalkaskaden verbunden sind (Linke und Krüger 2010; Kötter et al. 2014). In der Z-Scheibe wurde ein Komplex ausgemacht, der als mechanischer Dehnungssensor fungiert (Knöll et al. 2002). Der Komplex, zusammengesetzt aus *muscle* LIM protein (MLP), titin Z1Z2 Domänen und Telethonin (T-CAP), wird bei starken biomechanischen Belastungen aktiviert. Der aktivierte MLP-Komplex interagiert mit der Calcineurin/NFAT Kaskade, wodurch Zytokine ausgeschüttet werden und hypertrophe Remodelling Prozesse initiiert werden (Boateng et al. 2009). Neben den Komplexen in der Z-Scheibe befinden sich homologe Proteine der sogenannten MARP-Familie (*muscle-ankyrin-repeat proteins*) in der Ig-Domäne der I-Bande. Zu der MARP-Familie gehören CARP (cardiac ankyrin repeat protein), DARP (diabetes related ankyrin protein) und Ankrd2 (ankyrin-repeat-domain protein-2) (Miller et al. 2003). Es besteht die Annahme, dass MARPs einen wesentlichen Einfluss auf die Signalwege und Genexpression von Titin haben. Auch wenn MARPs für eine normale kardiale Funktion

nicht notwendig sind (Bang et al. 2014), so konnte im Skelettmuskel gezeigt werden, dass ein k*nock-out* der drei MARPs zu elastischeren Muskelfasern und einer längeren Titin-Isoform führte (Barash et al. 2007).

1.4.2 Veränderung der Titin-abhängigen passiven Steifigkeit im Herz- und Skelettmuskel durch posttranslationale Modifikation und Isoformen-Wechsel

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Titin-abhängige passive Steifigkeit zum einen durch posttranslationale Modifikation und zum anderen durch einen Isoformen-Wechsel moduliert werden kann. Die Modulierung durch posttranslationale Modifikation findet an den einzigartigen Sequenzen in der I-Bandenregion von Titin statt. Im Wesentlichen sind fünf Kinasen an der Phosphorylierung der elastischen Region von Titin beteiligt (Koser et al. 2019). Dazu gehören die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase Cα (PKCα), die cyclic guanosine monophosphate (cGMP) abhängige Proteinkinase G (PKG), sowie ERK2 und die Ca2+/calmodulin-dependent Proteinkinase IIS (CaMKIIS) (Linke und Hamdani 2014). Diese Kinasen besitzen die Fähigkeit, die passive Spannung der Kardiomyozyten über Titinphosphorylierung zu verändern (Kötter et al. 2013). Substrate der Kinasen sind die Phosphoserine in den unique sequences und der PEVK-Region der elastischen I-Bande. Die N2B unique sequence (us) im kardialen Titin wird durch die Kinasen PKA, PKG (Krüger et al. 2009), ERK2 (Raskin et al. 2012) und CaMKIIδ phosphoryliert (Hidalgo et al. 2013). Die PEVK-Region wird ebenfalls durch die CaMKII δ (Hidalgo et al. 2013), sowie durch PKC α (Hidalgo et al. 2009) phosphoryliert. Entsprechende Phosphoserine im kardialen Titin sind für die N2B(us) hauptsächlich S4010, S4062, S4099 und S4185, für die PEVK-Region S11878 und S12022 (Linke und Hamdani 2014). Die Phosphorylierungsstellen in der N2B(us) und PEVK-Region wurden entsprechend der Nomenklatur der humanen Titinsequenz (UniProtKB Identifikator Q8WZ42-1) nummeriert. Unter pathologischen Herz- und Kreislaufzuständen als auch bei Stoffwechselerkrankungen kommt es zu posttranslationalen Modifikationen, die die passive Steifigkeit der Muskulatur verändert. In Experimenten an Mäusen, die einer Ischämie und Reperfusion (I/R) ausgesetzt waren, konnte eine Hypophosphorylierung des PKA- und ERK2-abhängigen Phosphoserins S4010 festgestellt werden (Kötter et al. 2016). Der PKG-abhängig phosphorylierte Serinrest S4099 blieb in I/R- Mausmodellen unverändert (Kötter et al. 2016), in anderen Tiermodellen mit erkrankten Herzen kam es PKG-abhängig ebenfalls zu einer Hypophosphorylierung (Hamdani et al. 2013; Mohamed et al. 2016). In der N2B(us)-Region geht die Hypophosphorylierung mit einem Anstieg der passiven Steifigkeit einher, was vereinbar ist mit der Annahme, dass die Phosphorylierung der N2B(us) die passive Spannung der Kardiomyozyten senkt (Koser et al. 2019). In Kardiomyozyten von I/R-Rattenmodellen zeigten die PKCa- und CaMKIIδabhängigen Substrate der **PEVK-Region** Unterschiede in der Phosphorylierung. Die I/R-Mäuse zeigten eine PKCα -abhängige Hyperphosphorylierung an der Stelle S11878, die PKCa- und CaMKIIô- abhängige S12022 wurde hingegen hypophosphoryliert (Kötter et al. 2016). Für die skelettale N2A-Region ist bisher bekannt, dass die dort befindlichen vier IG-Domänen, sowie die unique sequence insertion durch die PKG phosphoryliert werden (Krüger et al. 2009). Jedoch kommt es wahrscheinlich zu keiner Veränderung der mechanischen Eigenschaften durch die PKG-Phosphorylierung (Krüger et al. 2009). Als weitere Kinase der N2A-Region wurde PKA ausgemacht, welches die unique sequence insertion als Substrat nutzt und dessen PKA-vermittelte Phosphorylierung durch Proteine der MARP-Familie blockiert wurde (Lun et al. 2014).

1.5 Zielsetzung

Ischämische Herzkrankheiten gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Klinisch präsentieren sich Menschen mit Diabetes mellitus mit schnellerer Ermüdbarkeit, einer Kraftminderung und Skelettmuskelatrophie.

Dass myokardiale Ischämie zu erheblichen metabolischen und ionischen Störungen führt, ist bekannt. Welche Auswirkungen eine myokardiale Ischämie im Skelettmuskel hat, ist noch weitestgehend unbekannt.

Als Modell der Untersuchung wurden Skelettmuskeln (M. psoas, M. tibialis anterior und M. extensor digitorum longus) aus acht Wochen alten C57BL/6-Mäusen, die für zehn Tage eine *high-fat and high-sucrose diet* (HFD) erhielten sowie operativ einer kardialen Ischämie für 45 Minuten mit nachfolgender Reperfusion für 21 Tage ausgesetzt wurden (HFD+ I/R), betrachtet. Als Kontrolle dienten Tiere mit Standarddiät (SD). Auch die SD-Tiere wurde mit einer Ischämie und Reperfusion behandelt (SD+ I/R).

Ziel der Arbeit war es festzustellen, welche chemischen Modifikationen im diabetischen Skelettmuskel, im ischämischen Skelettmuskel und im diabetischen Skelettmuskel nach Ischämie und Reperfusion stattfinden. Hierfür sollte eine Analyse der posttranslationalen Modifikationen auf das Skelettmuskelprotein Titin untersucht werden. Weiterführend sollte die Kinase PKCα hinsichtlich des Phosphorylierungslevels untersucht werden, da diese eine maßgebliche Rolle in der Phosphorylierung der elastischen PEVK-Region spielt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich im diabetischen und ischämischen Skelettmuskel Änderungen in der Protein-Qualitätskontrolle finden lassen. Hierzu sollten die Kinase AMPK und die Titin Isoform N2A mit seinem spezifischen Abbauprodukt T2 durch SDS-PAGE Proteinanalyse untersucht werden.

Schließlich sollte die kontraktile Leistung im diabetischen und ischämischen Skelettmuskel untersucht werden. Dazu wurden die maximale Kraftentwicklung und die passive Spannung der präparierten Muskelfasern gemessen. Die verwendeten Muskeln unterscheiden sich hinsichtlich Leistung, Funktion und Faserzusammensetzung und können einen Hinweis geben, ob etwaige Anpassungen muskelspezifisch oder unspezifisch sind.

Abschließend kann eine Aussage getroffen werden, ob eine Relation zwischen modifizierten Phosphorylierungsleveln und kontraktiler Leistung besteht und ob diese in Verbindung mit einer veränderten Degradation von Titin gebracht werden kann.

Die vorliegende Arbeit könnte Hinweise auf molekulare Trigger und Signalwege liefern, die zu einer Skelettmuskelatrophie und Kraftminderung im diabetischen Skelettmuskel führen. Zudem könnte eine Verbindung zwischen erhöhtem Abbau von Titin und einer eingeschränkten kontraktilen Leistung im diabetischen und ischämischen Skelettmuskel aufgedeckt werden. Denkbar ist, dass die möglichen Zusammenhänge, die sich aus der vorliegenden Arbeit ergeben, mittel- bis langfristig ein tieferes Verständnis für die Kompensationsmechanismen im geschädigten Skelettmuskel liefern. Damit könnten therapeutische Ansätze aufgezeigt und Präventionsmaßnahmen angestoßen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material/ Gewebeproben

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris
	2 M Glycin
	1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
10x TBST (pH 7,4)	0,2 M Tris/ HCL
	1,5 M NaCl
	1% Tween 20
4x SDS Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris/ HCl
	0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
4x SDS Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris/ HCl
	0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Aktivierungslösung	10 mM Imidazol
	3 mM Ca ²⁺ -EGTA
	10 mM Na ₂ MgATP
	3 mM MgCl ₂
	47,7 NaCrP
	2 mM DTT
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris/HCL
	100 mM Tricine
Blockierungslösung	2% BSA in 1x TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocapronsäure
	30 mM Tris/ HCL
low-ionic strength Buffer (pH 7,1)	75 mM KCL
	10 mM Tris/HCL
	2 mM MgCL ²

	2 mM EGTA
Phosphatase-Inhibitor Cocktail	500 M Natriumfluorid
	10 mM Natriumorthovanadat
	100 mM Natriumdiphosphat
	100 mM ß-Glycerophosphat
Protease- Inhibitor Cocktail	104 mM AEBSF
	80 µM Aprotinin
	4 mM Bestatin
	1.4 mM E-64
	2 mM Leupeptin
	1.5 mM Pepstatin A
PVDF destain	10% (v/v) Essigsäure
	40% (v/v) Ethanol
PVDF stain	0,075% Serva Blue in Methanol
Relaxationslösung	10 mM Imidazol
	3 mM EGTA
	10 mM Na2MgATP
	3 mM MgCl ₂
	47,7 mM NaCrP
	2 mM DTT
Titinprobenpuffer (pH 6,8)	8 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	3% (v/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
	0,035% (w/v) Serva Blue
	10% (v/v) Glycerol
	0,05 M Tris/ HCl
Stripping Buffer	6 M Guanidinhydrochlorid
	20 mM Tris
	0,2% Nonident P40
	0,1 М ß-Mercaptoethanol

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2, 3 Butandionmonoxim (BDM)	Sigma
Aceton	Merck
Acrylamid /Bis	Roth
Acrylamid /Bis 29:1	Biorad
Adenosin-5`triphosphatnatrium	Appli Chem
Agarose LE	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Appli Chem
Bovine Serum Albumin	Capricon
Bradford-Reagenz	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Carnitin	Sigma
Creatin	Sigma
Creatinphosphatdinatrium (Na2CrP)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem
ECL (Western blotting detektion reagent)	7Bioscience
Essigsäure	Appli Chem
Ethanol absolut	VWR
Ethanol vergällt	VWR
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Glukose	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Harnstoff	Aplli Chem
Imperial protein stain	Pierce
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Sigma
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
---------------------------------------	-----------------------
Natriumhydrogenphosphat	Sigma
Polysorbat 20 (Tween [®] 20)	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma
Salzsäure 32%	Merck
Serva Blue R	Serva Electrophoresis
ß-Mercaptoethanol	Sigma
Temed	Appli Chem
Thioharnstoff	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)	Roth
Triton X-100	Appli Chem

2.1.4 Lösungen für die Kraftmessung

Tabelle 5	: Lösungen	für die	Kraftmessung
-----------	------------	---------	--------------

Lösung	Zusammensetzung
Aktivierungslösung	10 mM Imidazol
	3 mM Ca ²⁺ -EGTA
	10 mM Na ₂ MgATP
	3 mM MgCl ₂
	47,7 mM NaCrP
	2 mM DTT
Relaxationslösung	10 mM Imidazol
	3 mM EGTA
	10 mM Na2MgATP
	3 mM MgCl ₂
	47,7 mM NaCrP
	2 mM DTT
	Am Tag der Verwendung frisch
	dazugegeben:
	30 mM BDM
	500 mM DTT

	400 µl Phosphatase- Inhibitor Cocktail
	200 µl Protease- Inhibitor Cocktail
Waschlösung	10 mM Imidazol
	3 mM EGTA
	10 mM Na2MgATP
	3 mM MgCl ₂
	47,7 mM NaCrP
	2 mM DTT
	Am Tag der Verwendung frisch
	dazugegeben:
	500 mM DTT
	400 µl Phosphatase- Inhibitor Cocktail
	200 µl Protease- Inhibitor Cocktail

2.1.5 Laborgeräte

Tabelle 6: Laborgeräte

Laborgerät	Тур	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Binokular	S8AP0	Leica
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo	Biorad
Chemiluminescent Imager	Fusion FX	Vilber and Lourmat
Elektrophorese-Kammer	Mini-Twin	Biometra
Elektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Fasermessapparatur	MYOSCOPE System	MyoTronic
Feinwaage	AE163	Mettler
Gefrierschrank	Тур 311104	Liebherr
Heizblock/Thermomixer	Compact 5350	Eppendorf
Kombischüttler	SM-30	Bühler
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Magnetrührer	Professional Serie	VWR
Mikroskop	AE2000	Motic
Mikrowelle	Micromat 135	AEG

Mikrozentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Netzteil	Power Pack 25	Biometra
PC-Rechner	Elite Desk 800 G2 TWR	HP
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo
Reagentienschüttler	444-1372	VWR
(Vortexer)		
Taumelrollmischer	RM5-30V	CAT
Waage	Kern 572	Kern
Wasseraufbereitung	Milli Q	Millipore
Wasserbad	3042	Köttermann
Zentrifuge	Rotofix 32 A	Hettich Zentrifugen

2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Primäre			
α-pAMPK Thr172	Kaninchen	1:2000 (v/v) 0,5% BSA	Cell Signaling
α-AMPK-pan	Kaninchen	1:1000 (v/v) 0,5% BSA	Abcam
α-pPKC T497	Kaninchen	1:5000 (v/v) 0,5% BSA	Abcam
α-ΡΚCα	Kaninchen	1:10000 (v/v) 0,5% BSA	Abcam
Titin-Antikörper			
α-PEVK-pan	Kaninchen	1:30000 (v/v) 0,5% BSA	Eurogentec
α-pPEVK S11878	Kaninchen	1:2000 (v/v) 0,5% BSA	Eurogentec
α-pPEVK S12022	Kaninchen	1:2000 (v/v) 0,5% BSA	Eurogentec
Sekundäre			
Anti-rabbit IgG,	Ziege	1:5000 (v/v)	Acris Antibodies
horseradish-			GmbH
peroxidase-linked			

2.1.7 Software

Tabelle 8: Software

Programm	Hersteller
EvolutionCapt Edge	Vilber & Lourmat
Image Lab 6.0.1	Bio-Rad Laboratories
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation
Microsoft Paint 2016	Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation
MyoDat 8	MIE Medical Research Ltd.
Prism 8	GraphPad Software
Servier Medical Art	Les Laboratoires Servier

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Proben

Genehmigung

Die verwendeten Proben wurden durch die Kooperationspartnerin und Zweitbetreuerin Frau Prof. Dr. Maria Grandoch aus dem Institut für translationale Pharmakologie in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Protokolle zur Durchführung von Tierversuchen wurden vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) überprüft und genehmigt (Az. 81-02.04.2018.A079).

Verwendete Tiere

Die Versuche wurden an 8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen durchgeführt. 12 Mäuse wurden für einen Zeitraum von 10 Wochen mit einer Fett- und Sucrose-reichen Diät ernährt (*high-fat diet*). N=6 der *high-fat diet*-Mäuse und n=5 der Mäuse mit Standarddiät erhielten anschließend unter Fortführung der Fütterung eine operative kardiale Ischämie durch zweizeitiges Vorgehen. Zunächst erfolgte operativ die Ligatur des Ramus interventricularis anterior, kurz RIVA oder aus dem Englischen LAD (*left anterior descending arteri* (LAD). Als einer der beiden Hauptäste der A. coronaria sinistra wird über die LAD ein wesentlicher Teil des Herzmuskels mit Nährstoffen versorgt. 3 Tage

nach Legung des Ligaturfadens wurde durch Anhängen von Gewichten eine Ischämie herbeigeführt und mittels EKG (Elektrokardiogramm), durch Darstellung einer ST-Hebung, auf erfolgreiche Induktion überprüft. Nach 45 Minuten Ischämie wurden die Fäden durchtrennt und somit die Reperfusion eingeleitet. Nach 3 Wochen Reperfusion wurde mit hochdosierter Isoflurannarkose und anschließender zervikaler Dislokation der exitus letalis herbeigeführt und die entsprechenden Proben entnommen.

Anzahl der Versuchstiere

N=5 C57BL/6-Mäuse mit Standarddiät N=6 C57BL/6-Mäuse mit Standarddiät und kardialer I/R N=6 C57BL/6-Mäuse mit *high-fat diet* N=6 C57BL/6-Mäuse mit *high-fat diet* und kardialer I/R

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Probenaufbereitung

Die verwendeten Gewebeproben wurden bei -80°C gelagert. Zur Verarbeitung wurden die Gewebeproben auf einem gekühlten Uhrglas mechanisch, mittels Skalpells zerkleinert und mit einer Lösung aus 120 µL Titinprobenpuffer und 5% DTT vermengt. Die Proben wurden anschließend in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (2000g, 10s, RT) und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 96°C im Thermomixer denaturiert und erneut zentrifugiert. Die gelöste Probe wurde in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die ungelösten Gewebereste wurden verworfen.

2.2.2.2 Bradford Proteinbestimmung

Die Grundlage der Bradford Proteinbestimmung ist die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine wird eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm hin zu 595 nm bewirkt und die Zunahme der Absorption wird bei 595 nm überwacht (Bradford 1976). Die Zunahme der Absorption korreliert mit der Proteinkonzentration in der Lösung.

Für die Bradford Proteinbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe gemäß Tabelle 3 angefertigt. Zu den 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 800 µl H₂O und 200 µl Bradford Reagenz, wurden 2 µl einer 1:10 verdünnten Probenlösung zu pipettiert. Die verdünnte Probenlösung setzt sich aus 18 μ l H₂O und 2 μ l gelöster Probe zusammen. Vor jeder Messreihe erfolgte eine Kalibrierung des Bradford Photometers. Weiterhin wurde vorab eine Standard-Kalibrierung des Bradford Reagenz durchgeführt. Als Standardprotein wurde hier BSA verwendet. Daraus wurde die Kalibrierungsgerade gebildet, indem die Extinktion bei 595 nm gegen die Proteinkonzentration aufgetragen wurde. Berücksichtigt wurden nur Werte, die im linearen Bereich der Kalibrierungskurve lagen und aus der Doppelbestimmung wurden Mittelwerte gebildet. Die daraus gebildete lineare Regressionsgerade wurde in eine Exceltabelle eingetragen und ergab einen Regressionskoeffizienten von R²= 0,988.

2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Das im Titinprobenpuffer enthaltene SDS, führte zu einer Gesamtnegativladung der Proteine und bewirkte dadurch eine gegenseitige Abstoßung der Proteine. Weiterhin diente SDS als Reduktionsmittel und spaltete die für die korrekte Faltung verantwortlichen Disulfidbrücken. Um die denaturierten Proteine proportional zu ihrer Polypeptidkettenlänge nach aufzutrennen, wurde eine netzartige Gelmatrix verwendet. Hierzu wurde eine Gelmatrix aus 10% Polyacrylamidgel hergestellt und die Proben wurden entsprechend nach ihrer Proteinkonzentration aufgetragen. Je geringer die Polyacrylamid-Konzentration, desto feiner ist die Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse. In der vorliegenden Arbeit kamen zwei verschiedene Verfahren der SDS-Gelelektrophorese zum Einsatz. Das diskontinuierliche Verfahren ist gekennzeichnet durch eine Zweiteilung der Gelmatrix in Sammelgel und Trenngel. Hierbei wanderten die entfalteten und denaturierten Proteine im elektrischen Feld zunächst durch das Sammelgel und anschließend durch das Trenngeld in Richtung Anode. Die Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel sind Tabelle 9 zu entnehmen. Hier wurde ausschließlich 10% Polyacrylamid Gel verwendet. Die Polymerisierung startete mit der Zugabe des Katalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) und des Radikalinitiators Ammoniumpersulfat (APS). Zunächst wurde das Trenngel hergestellt und unmittelbar nach Zugabe von APS mittels Vortexer vermischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Isopropanol wurde auf die Trenngelschicht aufgetragen, verhinderte Unregelmäßigkeiten im Gel und schützte vor Sauerstoff. Für die Polymerisierung des Trenngels wurde eine Zeitspanne von 40 Minuten bei Raumtemperatur eingehalten. Isopropanol wurde der Gelmatrix mit Hilfe von Whatman Papern wieder entfernt. Im Anschluss wurde das Sammelgel nach Tabelle 9 hergestellt und auf das Trenngel aufgetragen. Zwischen die Glasplatten, in das Sammelgel, wird ein geeigneter Probenkamm eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisierung wurden die Probenkämme vorsichtig herausgezogen, wobei die Taschen für die Probenapplikation verblieben. Die Applikation der Proben erfolgte in 1x Laufpuffer. Eine Stromstärke von 15-30 mA wurde bei einer Laufzeit von 60-90 Minuten verwendet, um die Proteine aufzutrennen.

Lösung	Trenngel 10%	Sammelgel
37,5 % Acrylamid	5 ml	0,667 ml
H2O bidest	6,25 ml	3,025 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	3,75 ml	-
4x SDS-Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
TEMED	7,5 µl	15 µl
APS	75 µl	50 µl
Gesamtvolumen	15 ml	5 ml

 Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS-Standardgel

Um Titin mit einer Molekülmasse von 3-4MDa darzustellen, wurden mit 0,33% Agarose verstärkte 1,9% - 2,1% Polyacrylamidgele verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Titingele ist Tabelle 10 zu entnehmen. Zunächst wurden alle Chemikalien, bis auf APS und Agarose, in ein Falcon zusammengeführt und in einem Wasserbad auf 48°C erwärmt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle bei 800W verflüssigt und zusammen mit APS zu der aufgewärmten Lösung dazugegeben. Diese wurde zügig auf- und abpipettiert, zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit einem geeignetem Probenkamm abgeschlossen. Für die Polymerisierung wurde eine Zeit von mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur vorgesehen. Vor Probenapplikation im Laufpuffer wurden die Probenkämme vorsichtig herausgezogen und die Taschen für die Proteinproben sind verblieben. Eine Stromstärke von 2-6mA für 4-6 Stunden wurde verwendet, um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelelektrophoresesysteme Mini-Protean der Firma Biorad und Mini-Twin der Firma Biometra verwendet. Bei der SDS-Gelelektrophorese mit Standardgelen wurde in die erste Kammer ein SDS-Page Marker aufgetragen, um den Molekulargrößenbereich der Banden zu detektieren. Als Richtlinie für die Beendigung der Elektrophorese wurde die Bromphenolblau-Lauffront herangezogen. Die Elektrophorese galt als abgeschlossen, wenn die Lauffront den unteren Gelrand überquert hat.

Lösung	Titingel 1,9%	Titingel 2,1%
29% Acrylamid	1,27 ml	1,4 ml
H2Obidest	6,80 ml	6,67 ml
4x SDS-Trenngelpuffer	5 ml	5 ml
SDS 20%	100 µl	100 µl
TEMED	11,5 µl	11,5 µl
APS	150 µl	150 µl
Agarose 1,5%	6,67 ml	6,67 ml
Gesamtvolumen	20 ml	20 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung SDS-Titingel

2.2.2.4 Imperial Protein Färbung

Um die Titin Isoformen nach abgeschlossener Gelelektrophorese zu analysieren, wurden die Gele in die *Imperial Protein Stain* Lösung überführt. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Färbelösung mit dem Coomassie Farbstoff. Dieser Farbstoff benötigt ein saures Milieu, um an die basischen Seitenketten der Aminosäuren zu binden und diese zu färben. Dadurch ist eine Detektion von Proteinen mit einer Nachweisgrenze von 200-400 ng möglich. Die Gele wurden für mindestens eine Stunde in der Färbelösung belassen und anschließend für mindestens 12 Stunden mit H₂O_{bidest} gewaschen. Abbildung 5 zeigt ein exemplarisches Beispiel eines, mit Imperial Protein Stain, angefärbtem Gel. Die Titin Isoform T1 als auch die dazugehörige Degradationsbande sind deutlich zu erkennen.



Abb. 5: Exemplarische Darstellung der Titin-Isoformen im Skelettmuskel von Mäusen und im Herzmuskel von Ratten nach Färbung mit *Imperial Protein Stain*

Abbildung 5 zeigt die skelettale Titin Isoform N2A mit der Degradationsbande T2 sowie die kardialen Titin-Isoformen N2BA und N2B mit der Degradationsbande T2. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE der 1,9 % Titingele und anschließender Inkubation in die *Imperial Protein Stain* Lösung. Die Skelettmuskelproben stammen von Mäusen, die Herzmuskelproben von Ratten.

Aufgetragen wurde in folgender Reihenfolge: TA, M. Psoas+TA, M. Psoas, M. Psoas+EDL, M. Psoas, EDL, linker Ventrikel.

2.2.5 Western Blot

Zur Übertragung der Proteine von dem Elektrophoresegel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid-) Membran, wurde das semi dry Western Blot Verfahren angewandt. Die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine erzeugen auf der PVDF-Membran ein Signal in Form einer Bande. Auf die Kassette des Trans Blot Turbo wurden fünf in Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere platziert. Um die PVDF-Membran zu aktivieren, wurde diese in Ethanol getränkt und so auf die Whatman Papiere gelegt. Das Elektrophoresegel wurde vorsichtig von den Glasplatten gelöst und mittig, ohne überlappen auf der Membran platziert. Weitere fünf Whatman Papier wurden in Kathodenpuffer getränkt und auf das Polyacrylamid Gel gelegt, um dieses zu bedecken. Um sicherzustellen, dass das Paket aus Whatman Papier, PVDF-Membran und Elektrophoresegel keine Luftblasen enthält, wurde ein Roller eingesetzt, der überflüssige Pufferlösung mit möglichen Luftblasen entfernt. Um den Proteintransfer von Standardgelen zu starten, wurde die Kassette geschlossen und eine Stromstärke von 1,5A und eine maximale Spannung von 20V wurden für 12 Minuten über den Trans Turbo Blot (BioRad) erzeugt. Für Titingele wurde eine Stromstärke von 1,0A mit einer maximalen Spannung von 20V über 40 Minuten eingestellt. Dadurch wurde ein elektrisches Feld senkrecht zu den oben genannten Schichten angelegt. Um den Proteintransfer auf die PVDF-Membran zu kontrollieren, wird diese für etwa 30 Sekunden nach Beendigung des

Immunoblots in PVDF *Stain* (siehe Tabelle 3) getränkt. Die PVDF *Stain* Färbelösung enthält den Coomassie Farbstoff.

Im Folgenden wurde der ungebundene Farbstoff mit dem PVDF *Destain* (siehe Tabelle 1) für mindestens 5 Minuten wieder entfärbt. Durch dreimaliges Waschen mit 1x TBST (Tabelle 3) für jeweils 15 Minuten, wurde die Essigsäure des PVDF *Destain* entfernt.

Um die freien Bindungsstellen der Proteine auf der Membran zu blockieren, wurde 2% Rinderserumalbumin-Lösung (2% BSA) verwendet. Die Membran wurde für mindestens eine Stunde in der 2% BSA- Lösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit einem primären Antikörper (siehe Tabelle 7) für mindestens 12 Stunden. Darauffolgend wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten mit 1x TBST gewaschen, sodass die Membran daraufhin in der Lösung mit einem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 7) inkubiert werden konnte. Der an Meerrettichperoxidase gekoppelte sekundäre Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet und wurde für mindestens zwei Stunden in Lösung mit der Membran belassen. Erneut wurde ein dreimaliger Waschvorgang mit 1x TBST durchgeführt. Um den Western Blot und die Protein-Antikörper Interaktion zu visualisieren, wurde die Membran vollständig mit der zuvor im 1:1 Verhältnis gemischten Chemielumineszenzreagenz 1 und 2 (siehe Tabelle 4) benetzt. Das hochsensitive Signal, welches durch die Chemielumineszenzreagenz entsteht, wurde Fusion FX (Vilbert&Lourmat) detektiert. mittels Imager Um den Phosphorylierungsstatus der Proteine zu analysieren, wurden auf einen Blot sowohl Phospho-Antikörper als auch Pan-Antikörper gegeben. Der phosphorylierte Anteil des Proteins wurde mit dem Phospho-Antikörper detektiert und nach Zugabe des sekundären Antikörpers und anschließender Visualisierung mit *Stripping* Puffer (siehe Tabelle 3) wieder entfernt. Der Stripping Buffer enthält ß-Mercaptoethanol, wodurch die Disulfidbrücken der Antikörper getrennt und die Antikörperbindungsstellen wieder für neue Antigen-Antikörper Reaktion frei wurden. Im nächsten Schritt wurde der Stripping Puffer in mindestens fünf Waschvorgängen mit 1x TBST entfernt. Anschließend wurde derselbe Blot erneut blockiert und in der Lösung mit Pan-Antikörpern inkubiert. Der Pan-Antikörper wurde im Sinne eine Beladungskontrolle eingesetzt. Die Phospho- und Pan-Antikörpersignale, die sich auf dem Blot als Bande darstellten, wurden anhand ihrer Pixeldichte densitrometrisch mit dem Programm ImageLab (Biorad) erfasst und ausgewertet. Die ermittelten Werte der Phospho- und Pan-Antikörpersignale wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und auf die jeweilige Kontrolle der Beladung normiert. Jede Probe wurde auf jeweils zwei separate Gele aufgetragen und nach Normierung wurden die Mittelwerte der erfassten Daten gebildet.

2.2.3. Kraftmessung an gehäuteten Skelettmuskelfasern

2.2.3.1 Präparation und Lagerung der Skelettmuskelfasern

In der vorliegenden Arbeit wurden Skelettmuskeln von Mäusen verarbeitet, die nach Präparation unverzüglich in einer Petrischale unter Spannung fixiert wurden. In der Petrischale befand sich eine Lösung aus 50% Glycerol und 50% *low ionic strength* Puffer (siehe Tabelle 1), die das Gewebe vor proteolytischer Degradation schützt. Durch die Zugabe von Glycerol in der Lösung war es möglich, die semikristalline Struktur der Sarkomere auch während des Einfrier- und Auftauprozesses zu erhalten. Die Lagerung erfolgte bei -20°C für maximal sechs Wochen.

2.2.3.2 Häutung der Skelettmuskelfasern

Um das zelluläre Calcium zu entfernen, wurden die Skelettmuskelfasern zur Häutung zunächst in der Petrischale auf Eis gelegt. Die Lösung aus Glycerol und low ionic strength Puffer wurde abpipettiert und unter Zugabe der Relaxationslösung mit 1% Triton-X-100, wurde die Faser über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 2°C Umgebungstemperatur chemisch gehäutet. Alternativ wurde eine 3% Triton-X-100 Relaxationslösung (siehe Tabelle 3) verwendet, in der die Muskelfasern für mindestens zwei Stunden, in einer Petrischale auf Eis, gehäutet wurden. Das darin enthaltene Triton-X-100 ist ein Detergenz, dass die Zellmembran und damit auch die Struktur der extrazellulären Matrix zerstört. Strukturell intakte Kollagenfasern der extrazellulären Matrix könnten die Ergebnisse der Kraftmessung maßgeblich beeinflussen. Durch die Häutung ist es daher möglich, die erhaltenen passiven Kraftdaten als hauptsächlich Titin-basiert zu interpretieren. Nach der chemischen Häutung wurde das Triton-X-100 in drei Waschschritten, für je 15 Minuten, von den Fasern entfernt. Für die Waschschritte wurde die Waschlösung (Tabelle 5) verwendet. Die anschließende Präparierung einzelner Muskelfasern aus dem gehäuteten Faserbündel erfolgte ebenfalls in der Waschlösung (siehe Tabelle 3).

2.2.3.3 Aktive und passive Kraftmessung

Um die aktiven und passiven Kräfte der gehäuteten Muskelfasern zu messen, wurde das MYOSCOPE System der Firma MyoTronic verwendet. In die Drehscheibe wurden vier Reservoirs eingelassen, die mit unterschiedlichen Lösungen befüllt wurden. Reservoir 1 wurde mit der in Tabelle 5 angegebenen Relaxationslösung (RS+ BDM, DTT, Phosphatase Inhibitor, Protease Inhibitor) befüllt. Protease- und Phosphatase- Inhibitor Cocktail schützen die Muskelfaser vor Phosphorylierungen und Proteolyse. Das enthaltene BDM wirkt als Inhibitor für das, für die Kontraktion notwendige, Myosin-II. Dadurch kann in dieser Lösung die Ca²⁺⁻abhängige, passive Dehnungskraft ermittelt werden. Reservoir 2 und 3 wurden mit der aus Tabelle 5 angegebenen Waschlösung befüllt. Die BDM-freie Waschlösung diente dem Zweck, das gebundene BDM wieder von der Muskelfaser zu entfernen. Reservoir 4 wurde mit der Ca²⁺-haltigen Aktivierungslösung (siehe Tabelle 5) befüllt, da die Kontraktion der Skelettmuskelfasern Calcium-abhängig gesteuert wird. Die gehäutete Muskelfaser wurde am MYOSCOPE System an zwei Greifarmen fixiert. Eine Halterung des Greifarms diente als Längengeber (galvanometer Motor, MyoTronic UG), die andere Halterung diente als Kraftaufnehmer (force transducer, MyoTronic UG) (siehe Abb. 6). Der Abstand der beiden Greifarme zueinander variierte zwischen 2000 µm und 3000 µm und wurde, mit einer im Binokular integrierten Skala, überprüft. Über einen Hebel konnten die Greifarme vertikal auf und ab bewegt werden, sodass ein Transfer der aufgespannten Fasern zwischen den Reservoirs des Drehtisches einwandfrei möglich war. Das MyoTronic System wurde verbunden mit der Software MYODAT, wodurch die erfassten Daten registriert wurden und Programmeinstellungen konfiguriert werden konnten. Die Konfigurierung erfolgte so, dass die fixierte Faser in fünf Stufen für jeweils 15 Sekunden um je 10% der aufgespannten Länge gedehnt wurde.

Für die passive Kraftmessung wurde die fixierte Muskelfaser in Reservoir 1 in die entsprechende Lösung eingetaucht. Die stufenweise Dehnung der Faser wurde durch den Längengeber gewährleistet, die ausgeübten passiven Kräfte wurde durch den Kraftaufnehmer erfasst und in Form eines Graphen (siehe Abb. 7) dokumentiert. Erfasst wurden die Kraftdaten bei konstantem Kraftsignal am Ende der jeweiligen Dehnungsphase. Um sicherzustellen, dass die Muskelfaser stabil fixiert wurde, diente die erste Messung lediglich der Festigkeitskontrolle. Die darauffolgenden drei Messungen, der passiven Kraft in fünf Stufen, wurden graphisch erfasst und die ausgeübten Kräfte wurden notiert. Zwischen den einzelnen Programmen wurde eine Pausenzeit von mindestens 15 Sekunden eingehalten.

Nach Abschluss der drei passiven Kraftmessreihen, blieb die einzelne Faser weiterhin aufgespannt zwischen den beiden Greifarmen und wurde in Reservoir 2 überführt. Da ein Transfer von BDM aus Gefäß 1 nach Gefäß 2 und damit eine unzureichende *Clearance* der Faser mit BDM nicht auszuschließen war, wurde die Faser nach Inkubation in Reservoir 2 für mindestens 2 ½ Minuten, weitere 2 ½ Minuten in Reservoir 3 mit der Waschlösung inkubiert. Somit konnte danach angenommen werden, dass die Skelettmuskelfaser frei von BDM war. Noch in Reservoir 3 wurde das Programm für die aktive Kraftmessung gestartet.

Das Programm für die aktive Kraftmessung wurde so konfiguriert, dass die aufgespannte Faser in Reservoir 3 um 114% ihrer Länge gespannt wurde und dann unverzüglich in Reservoir 4 transferiert wurde. Die Dehnung wurde für 150 Sekunden aufrechterhalten, die aktive Kraft der Muskelfaser wurde graphisch erfasst und der Ausgangswert und Maximalkraftwert wurden notiert. Im Anschluss wurde die Muskelfaser vorsichtig von den Greifarmen gelöst und der Durchmesser der Muskelfaser wurde, mit einer auf einem Objektträger aufgetragenen Skala, unter dem Binokular gemessen.



Abb. 6: Schematische Darstellung der Fasermessapparatur MYOSCOPE System (modifiziert nach van der Velden et al., 1998)

Die Muskelfaser wurde nach Präparation am Kraftaufnehmer und Längengeber fixiert und entsprechend in die vorgesehenen Reservoirs inkubiert. Die Reservoirs konnten manuell auf einer Drehscheibe rotiert werden. Das MYOSCOPE System ist mit der MYODAT Software gekoppelt, sodass die erhobenen Daten direkt transferiert und gespeichert werden konnten.



Abb. 7: Passive Zugspannung unter stufenweiser Dehnung am Beispiel einer Muskelfaser des M. tibialis anterior

Dargestellt ist die Messung der passiven Zugspannung in drei Messvorgängen unter stufenweiser Dehnung. Auf der Y-Achse ist die Kraftentwicklung in mN angegeben, auf der X-Achse die fortlaufende Zeitspanne in Sekunden. Die Messung der Kraftdaten erfolgte bei konstantem Kraftsignal zum Ende der entsprechenden Dehnungsphase.

2.2.4 Statistische Datenanalyse

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 8. Durchgeführt wurden One-way und Two-way ANOVA, gefolgt von einem Šidák post-Hoc-Test. Bei einem p-Wert von <0,05 wurde eine statistische Signifikanz angenommen und in den Graphen entsprechend, mit einem Asterisk (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob die HFD und die I/R einen Einfluss auf Titin in der Skelettmuskulatur haben, wurde an Muskelfasern vom M. Psoas, M. tibialis anterior und M. extensor digitorum longus die passive Spannung und die aktive Kraftentwicklung bestimmt. Zudem wurde die relative Phosphorylierung in der elastischen I-Bandenregion von Titin anhand von Gewebeproben der drei Muskelgruppen analysiert. Dazu wurden mittels Western Blot Analysen die Serienreste 12022 und 11878 der PEVK-Domäne, die Kinasen PKC α und AMPK der elastischen I-Bandenregion sowie das Verhältnis zwischen intaktem Titin (T1) und dem Abbauprodukt (T2) untersucht.

3.1 Analyse der passiven Spannung und der maximalen Kraftentwicklung im M. Psoas

Das Gerüstprotein Titin, mit seiner elastischen I-Bande kann als molekulare Feder verstanden werden und trägt wesentlich zur aktiven Kraftentwicklung und passiven Spannung der Skelettmuskulatur bei (Horowits et al. 1986). Um zu eruieren, ob *high-fat diet* und kardiale Ischämie und Reperfusion einen Einfluss auf die Titin-bedingte aktive und passive kontraktile Leistung der Skelettmuskulatur haben, wurden einzelne Muskelfasern des M. Psoas hinsichtlich ihrer passiven Spannung und maximalen Ca²⁺-induzierten Kraftentwicklung untersucht. Abbildung 8 (A) zeigt die Ergebnisse der passiven Kraftmessung für den M. Psoas. Die passive Spannung bei den verschiedenen Dehnungsstufen war in den Fasern der SD-Gruppe am höchsten (schwarze Kurve). Die Fasern der *high-fat diet* -Tiere zeigten eine signifikant verminderte passive Spannung bei allen Dehnungspunkten (rote Kurve, p<0,0001). I/R führte zu einem signifikanten Abfall der passiven Spannung in den SD-Tieren (blaue Kurve, p<0,0001). In den *high-fat diet* - Tiere n führte I/R dagegen zu einem Anstieg der passiven Spannung (grüne Kurve, p<0,0001).

Wie in Abbildung 8 (B) zu sehen ist, führt *high-fat diet* zu einer signifikanten Abnahme der aktiven Kraftentwicklung im M. Psoas, verglichen mit SD. I/R führte in den Kontrolltieren mit SD zu einer signifikanten Abnahme der maximalen aktiven Kraftentwicklung (Fmax). In den *high-fat diet*-Mäusen war Fmax bereits basal signifikant gegenüber den Kontrolltieren vermindert und war nach I/R etwas erhöht (nicht statistisch signifikant). Die Ergebnisse der maximalen Kraftentwicklung im M. Psoas.



Abb. 8: Passive Zugspannung und maximale Ca²⁺⁻induzierte Kraftentwicklung im M. Psoas

(A) Passive Zugspannung in Relation zu stufenweiser Dehnung der Muskelfaser bei einer Ausgangslänge der Muskelfaser von 2000 μ m-3000 μ m. (B) Maximale Ca²⁺induzierte Kraftentwicklung pro Querschnittsfläche (CSA=*cross-sectional area*). Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angegeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *two-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,001 mit drei Asterisken (***) und p<0,0001 mit vier Asterisken (****) akzeptiert. Die Linien in Abb. 7 (A) sind *second-order polynominal fits* der Daten aus den passiven Kraftmessungen am M. Psoas.

3.2 Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung im

M. Psoas

3.2.1 HFD-vermittelte Hypophosphorylierung von Titin an S12022

Wie in Abbildung 9 (A) dargestellt, zeigte sich für den M. Psoas der *high-fat diet*-Mäuse eine signifikante Hypophosphorylierung von Titin am Serinrest S12022, verglichen mit den Kontrolltieren mit SD. In SD-Tieren führt I/R zu keiner signifikanten Änderung der relativen S12022 Phosphorylierung (Abb. 9 A).

In der Gruppe von *high-fat diet*-Mäusen zeigte sich ein leichter Anstieg der relativen Phosphorylierung durch kardiale I/R, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die relative Phosphorylierung an Titin S11878 war weder unter dem Einfluss der Diät, SD versus *high-fat diet*, noch durch I/R signifikant verändert (Abb. 9 B).



Abb. 9: Relative Titin-Phosphorylierung an den Serienresten 12022 und 11878 der PEVK-Domäne im M. Psoas

Relative Phosphorylierung von S12022 (A) und S11878 (B) in Kontrolltieren mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angegeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *two-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,01 mit zwei Asterisken (**) gekennzeichnet. Über der Abbildung sind jeweils repräsentative Blots der N2A-Isoform (3,3-3,7 MDa) dargestellt, auf denen die Phospho- und Pan-Antikörpersignale zu sehen sind.

3.2.2 Verringerte Phosphorylierung der Kinase AMPK durch kardiale I/R in den *high-fat diet*-Mäusen

Diabetes führt zu einer metabolischen Dysfunktion im Skelettmuskel sowie zu einem Ungleichgewicht in der kontraktilen Proteinsynthese und des Proteinabbaus, was schließlich zur Skelettmuskelatrophie führt, wie in Kapitel 1.1.3 und 1.1.4 erläutert wurde. Die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) dient als Sensor für den zellulären Energiestatus und ist zudem an der Regulation des Proteinabbaus beteiligt (Carling 2004). Durch Phosphorylierung des *forkhead box protein O3a* (FOXO3a) reguliert AMPK die Transkription der E3-Ligasen, die wiederum den Proteinabbau verstärken (Kjøbsted et al. 2018). Die PKCα spielt eine maßgebliche Rolle in der Phosphorylierung der PEVK-Region (Hidalgo et al. 2009). Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine kardiale I/R und ein diabetischer Stoffwechsel auf die Kinaseaktivität von AMPK und PKC haben, wurden

die Phosphorylierungslevel mit Western-Blots und phosphospezifischen Antikörpern erfasst und in Abb. 10 dargestellt.

HFD führte, verglichen mit den SD-Kontrolltieren, zu keiner veränderten Phosphorylierung von PKC α an Position S497. Auch kardiale I/R zeigte keine signifikanten Änderungen der relativen Phosphorylierung der Kinase PKC α an Position S497 an den SD-Tieren. Zudem wurde kein Einfluss von kardialer I/R auf die Phosphorylierung von PKC α in den HFD-Tieren festgestellt (Abb. 10 A).

Wie Abb. 10 (B) zeigt, führte HFD im M. Psoas zu einer verstärkten Phosphorylierung der AMPK, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Kardiale I/R führte im M. Psoas der Kontrolltiere ebenfalls zu einer verstärkten Phosphorylierung der AMPK, jedoch mit p>0,05 statistisch nicht signifikant. In den HFD-Tieren führte. kardiale I/R hingegen zu einer reduzierten Phosphorylierung der AMPK (p=0,0652).



Abb. 10: Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCa und AMPK im M. Psoas

Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα (A) und AMPK (B) für Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angegeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6. Das Molekulargewicht (MW) für pPKC beträgt 77 kDa, für pAMPK 62 kDa.

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *two-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,05 mit einem Asterisk (*), p<0,01 mit zwei Asterisken (**), p<0,001 mit drei Asterisken (***) und p<0,0001 mit vier Asterisken (****) akzeptiert.

3.2.3 *High-fat diet* und Ischämie und Reperfusion führen zu keiner signifikanten Veränderung des T2/T1-Verhältnisses

Die Abbildung 11 zeigt das Verhältnis des *full length* Titin (T1) zum spezifischen Titin Abbauprodukt (T2). Eine Veränderung des T2/T1-Verhältnisses könnte einen Hinweis auf einen Einfluss der HFD und/oder der kardialen I/R auf die Autophagieprozesse und damit den Abbau von Titin geben.

In Tieren mit HFD konnten keine deutlichen Unterschiede im T2/T1 Verhältnis gegenüber den Kontrolltieren mit SD festgestellt werden.

Festgestellt wurde jedoch ein leicht erhöhtes Vorkommen des Titin Abbauprodukts T2 unter dem Einfluss von kardialer I/R bei den Kontrolltieren mit SD. In Tieren mit HFD konnten keine deutlichen Unterschiede im T2/T1 Verhältnis durch den Einfluss von I/R festgestellt werden. Die Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant.



Abb. 11: Titin Isoformverhältnis des *full-length* Titin (T1) zum spezifischen Abbauprodukt (T2) im M. Psoas

T2/T1-Isoformverhältnis für Kontrolltiere mit Standarddiät (SD) für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Die repräsentativen Titinbanden (T1) mit Degradationsbanden (T2) sind für die jeweilige Kondition oberhalb des Balkendiagramms dargestellt. Angeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *one-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,05 mit einem Asterisk (*), p<0,01 mit zwei Asterisken (**), p<0,001 mit drei Asterisken (***) und p<0,0001 mit vier Asterisken (****) akzeptiert.

3.3 Analyse der passiven Spannung und der maximalen Kraftentwicklung im M. tibialis anterior

Anders als der M. Psoas (Kapitel 3.1) befindet sich der M. tibialis anterior (TA) in anderer topographischer Lage (Abb.4) und besitzt andere histochemische Eigenschaften (Tab. 2). Um zu untersuchen, ob kardiale Ischämie und Reperfusion sowie *high-fat diet* auch zu maladaptiven mechanischen Funktionen im TA führen, wurden die passive Spannung und maximale Kraft gemessen.

Durch den Einfluss von HFD wurde eine signifikant (p<0,0001) erhöhte passive Spannung im TA, verglichen mit den SD-Mäusen, gemessen (Abb. 12 (A)). Kardiale I/R führte im TA der SD-Mäuse ebenfalls zu einer gesteigerten passiven Zugspannung (p<0,0157). In der Gruppe der HFD-Mäuse wurde die passive Spannung unter kardialer I/R deutlich und signifikant reduziert (p<0,0001).

Die aktive Kraftentwicklung blieb im TA durch HFD nahezu unverändert. SD-Mäuse zeigten eine verringerte aktive Kraftentwicklung durch I/R. In den HFD-Mäusen wurde ebenfalls eine Verringerung der maximalen Ca²⁺⁻induzierten Kraft durch I/R festgestellt (Abb. 12 B).



Abb. 12: Passive Zugspannung und maximale Ca²⁺⁻induzierte Kraftentwicklung im M. tibialis anterior

(A) Passive Zugspannung in Relation zu stufenweiser Dehnung der Muskelfaser bei einer Ausgangslänge der Muskelfaser von 2000μm-3000μm. (B) Maximale Ca²⁺induzierte Kraftentwicklung pro Querschnittsfläche (CSA=*cross-sectional area*). Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angegeben werden die Mittelwerte \pm Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *two-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,0001 mit vier Asterisken (****) akzeptiert. Die Linien in Abb. 12 (A) sind *second-order polynominal fits* der Daten aus den passiven Kraftmessungen am M. tibialis anterior.

3.4 Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung im M. tibialis anterior

3.4.1 Unveränderte Phosphorylierung von Titin an S12022 und S11878 im M. tibialis anterior

Da die kontraktilen Eigenschaften von skelettalem Titin durch posttranslationale Modifikationen - wie Phosphorylierung der elastischen I-Bande - stark verändert und beeinflusst werden, wurden mittels phospho-spezifischer Antikörper die Unterschiede in der Phosphorylierung von Titin an den Serinresten S12022 und S11878 untersucht.

Abbildung 13 zeigt die relative Titin-Phosphorylierung an Position S12022 (A) und S11878 (B) im M. tibialis anterior.

Im Vergleich beider Diätformen, der Kontrolltiere mit SD und der HFD-Tiere wurde eine verringerte Phosphorylierung am Serinrest S12022 der HFD-Mäuse festgestellt, jedoch ohne, dass eine statistische Signifikanz erreicht wurde (Abb. 13 A). Bei den SD-Tieren und auch bei den HFD-Tieren führte kardiale I/R zu keiner veränderten Phosphorylierung an S12022.

Wie Abbildung 13 (B) zeigt, führte HFD zu einer verringerten Phosphorylierung an S11878 im Vergleich zu den Kontrolltieren mit SD. Des Weiteren wurde eine verringerte Phosphorylierung an S11878 der SD-Mäuse durch kardiale I/R festgestellt. Auch in der Gruppe der HFD-Mäuse führte kardiale I/R zu einer verringerten Phosphorylierung an S11878. Die Ergebnisse der Phosphorylierung an S11878 im M. tibialis anterior zeigten keine statistische Signifikanz.



Abb. 13: Relative Titin-Phosphorylierung an den Serienresten S12022 und S11878 der PEVK-Domäne im M. tibialis anterior

Relative Phosphorylierung von S12022 (A) und S11878 (B) in Kontrolltieren mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für high-fat diet (HFD) und HFD + I/R. Angegeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Über der Abbildung sind jeweils repräsentative Blots der N2A-Isoform (3,3-3,7 MDa) dargestellt, auf denen die Phospho- und Pan-Antikörpersignale zu sehen sind.

3.4.2 Verstärkte Phosphorylierung der Kinase AMPK durch I/R in den SD- und HFD-Mäusen

AMPK dient als wichtiger Energieregulator der Zelle und kann die Herzmuskulatur vor Ischämie- und Reperfusionsschäden durch AMPK-abhängige Aktivierung von Adiponectin schützen (Shibata et al. 2005). Die PKC α zeigte bereits in Kardiomyozyten von I/R-Rattenmodellen Unterschiede in der Phosphorylierung entsprechender Substrate der elastischen I-Bande von Titin (Kötter et al. 2016). In Abbildung 14 ist die Kinaseaktivität von PKC α (A) und AMPK (B) im M. tibialis anterior unter dem Einfluss von *high-fat diet* und I/R dargestellt. Dazu wurden die Phosphorylierungslevel mit Western-Blots und phospho-spezifischen Antikörpern erfasst.

Die Untersuchungen an den HFD-Mäusen zeigten eine unveränderte Phosphorylierung der PKCα an Position T497. Kontrolltiere mit SD und I/R zeigten keine veränderte Phosphorylierung der PKCα an der Position T497, verglichen mit den Kontrolltieren mit SD ohne I/R. Eine leicht erhöhte Phosphorylierung der PKCα konnte in den HFD-Mäusen mit I/R festgestellt werden. Die Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Wie in Abbildung 14 (B) dargestellt, zeigte sich eine unveränderte Phosphorylierung der AMPK in den HFD-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren mit SD. I/R hingegen führte in den SD-Mäusen zu einer verstärkten Phosphorylierung der AMPK an der Position T172 im M. tibialis anterior. Zudem konnte auch in den HFD-Tieren eine verstärkte Phosphorylierung der AMPK unter dem Einfluss von kardialer I/R festgestellt werden. Die Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant, deuten jedoch auf die Rolle von AMPK im Schutz vor Ischämie- und Reperfusionsschäden in der Muskulatur hin.



Abb. 14: Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα und AMPK im M. tibialis anterior

Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα (A) und AMPK (B) für Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Das Molekulargewicht (MW) für pPKC beträgt 77 kDa, für pAMPK 62 kDa.

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *one-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,05 mit einem Asterisk (*), p<0,01 mit zwei Asterisken (***), p<0,001 mit drei Asterisken (***) und p<0,0001 mit vier Asterisken (****) akzeptiert.

3.4.3 Kardiale I/R führt zu einer verringerten Degradation in HFD-Mäusen

Abbildung 14 zeigt das Isoformverhältnis des *full-length Titin* (T1) zum spezifischen Abbauprodukt (T2) im M. tibialis anterior. Einen Einfluss von HFD auf die Autophagieprozesse, gemessen am T2/T1-Isoformverhältnis, konnte verglichen mit den SD-Tieren nicht nachgewiesen werden. Zudem konnte kein Unterschied im T2/T1-Isoformverhältnis in der Gruppe von Mäusen mit SD durch den Einfluss von I/R festgestellt werden. Innerhalb der Gruppe der HFD-Mäuse zeigte sich ein verringertes Abbauprodukt und damit ein kleineres T2/T1-Isoformverhältnis durch den Einfluss von kardialer I/R. Die Ergebnisse in der Gruppe der HFD-Mäuse sind statistisch signifikant (p<0,01) und deuten auf einen Effekt von I/R auf die Autophagieprozesse von Titin im M. tibialis anterior der HFD-Mäuse hin.



Abb. 15: Titin Isoformverhältnis des *full-length Titin* (T1) zum spezifischen Abbauprodukt (T2) im M. tibialis anterior

T2/T1-Isoformverhältnis für Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Die repräsentativen Titinbanden (T1) mit Degradationsbanden (T2) sind für die jeweilige Kondition oberhalb des Balkendiagramms dargestellt. Angegeben werden die Mittelwerte \pm Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *one-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,01 mit zwei Asterisken (**) akzeptiert.

3.5 Analyse der passiven Spannung und der maximalen Kraftentwicklung im M. extensor digitorum longus

Frühere Arbeiten an HFD-Mäusen konnten bereits zeigen, dass eine durch HFD induzierte Insulinresistenz zu einer signifikanten Reduzierung der Energiegewinnung in der Skelettmuskulatur führt (Yokota et al. 2009). Der EDL steht in enger topographischer Lage zum TA (Abb. 4) und besitzt zudem sehr ähnliche Faserzusammensetzungen wie der TA (Tab. 4). Daher bestand im Rahmen dieser Arbeit das Interesse, die sehr ähnlichen Muskeln EDL und TA sowie den topographisch und histochemisch unterschiedlichen M. Psoas miteinander zu vergleichen. Um die Frage zu klären, ob die mit HFD einhergehenden metabolischen Dysfunktionen neben den negativen Auswirkungen auf kardiovaskuläre Erkrankungen (Panchal et al. 2011) auch einen Einfluss auf die kontraktile Leistung des EDL haben, wurden die passive Spannung und maximale aktive Kraftentwicklung gemessen. Wie Abbildung 16 (A) zeigt, konnte eine signifikant (p<0,0001) reduzierte passive Spannung durch den Einfluss von HFD verglichen mit den Kontrolltieren registriert werden. In der Gruppe der SD-Tiere mit I/R wurde im Vergleich mit den Kontrolltieren ebenfalls eine signifikant (p<0,0001) verringerte passive Spannung der Muskelfaser des EDL festgestellt. Die basal schon reduzierte passive Spannung in der Gruppe der HFD-Mäuse wurde durch den Einfluss von kardialer I/R weiter reduziert (p<0,0001). Die in Abbildung 16 (A) dargestellten Ergebnisse sind statistisch signifikant (p<0,0001). In Abbildung 16 (B) ist die Entwicklung der maximalen Ca²⁺⁻induzierten aktiven Kraftentwicklung in den verschiedenen Gruppen (SD, SD+I/R, HFD und HFD +I/R) dargestellt. Im Vergleich der Diätformen SD gegen HFD konnte eine reduzierte maximale Kraftentwicklung in der Gruppe der HFD-Mäuse festgestellt werden (p<0,01). Des Weiteren führten Ischämie und Reperfusion in der Gruppe der SD-Mäuse zu einer statistisch signifikanten (p<0,01) Verminderung der maximalen aktiven Kraftentwicklung. Kardiale I/R zeigte bei den HFD-Mäusen auch eine Verminderung der maximalen aktiven Kraftentwicklung, jedoch ohne statistische Signifikanz.



Abb. 16: Passive Zugspannung und maximale Ca²⁺⁻induzierte Kraftentwicklung im M. extensor digitorum longus

(A) Passive Zugspannung in Relation zu stufenweiser Dehnung der Muskelfaser bei einer Ausgangslänge der Muskelfaser von 2000 μ m-3000 μ m. (B) Maximale Ca²⁺induzierte Kraftentwicklung pro Querschnittsfläche (CSA=*cross-sectional area*). Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *two-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,01 mit zwei Asterisken (**), bei p<0,0001 mit vier Asterisken (***) akzeptiert. Die Linien in Abb. 12(A) sind *second-order polynominal fits* der Daten aus den passiven Kraftmessungen am M. extensor digitorum longus.

3.6 Analyse der relativen Titin-Phosphorylierung im M. extensor digitorum longus

3.6.1 I/R- und HFD-vermittelte Erhöhung der Phosphorylierung am Serinrest 11878 der PEVK-Region

Die HFD führte verglichen mit den SD-Tieren zu keiner verringerten Phosphorylierung am Serinrest S12022 im EDL. Gegenüber der SD-Mäuse ohne I/R konnte eine geringfügig erhöhte Phosphorylierung an S12022 in der Gruppe der SD-Mäuse mit I/R festgestellt werden. Die HFD-Mäuse mit I/R zeigten keine veränderte Phosphorylierung am Serinrest 12022, verglichen mit den HFD-Mäusen ohne I/R. Die Ergebnisse aus Abb. 17 (A) zeigten keine statistische Signifikanz. Abbildung 17 (B) zeigt die Phosphorylierungslevel an Position S11878 der PEVK-Region. In der Gruppe der HFD- Mäuse zeigte sich verglichen mit den SD-Mäusen eine erhöhte Phosphorylierung von S11878 im EDL. Des Weiteren führte kardiale I/R im EDL der SD-Mäuse zu einer verstärkten Phosphorylierung von S11878. Unverändert blieben die Phosphorylierungslevel von S11878 durch den Einfluss von I/R in der Gruppe der HFD-Mäuse. Die Ergebnisse (Abb. 17(B)) erreichten keine statistische Signifikanz.



Abb. 17: Relative Titin-Phosphorylierung an den Serienresten 12022 und 11878 der PEVK-Domäne im M. Extensor digitorum longus

Relative Phosphorylierung von S12022 (A) und S11878 (B) in Kontrolltieren mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angegeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Über der Abbildung sind jeweils repräsentative Blots der N2A-Isoform (3,3-3,7 MDa) dargestellt, auf denen die Phospho- und Pan-Antikörpersignale zu sehen sind.

3.6.2 Unveränderte Phosphorylierungslevel im EDL durch PKCα

Abbildung 18 (A) zeigt die Phosphorylierungslevel der PKCα im M. extensor digitorum longus. Der Vergleich beider Diätformen (SD versus HFD) zeigte keine Auswirkung der HFD auf die Phosphorylierung an T497 von PKCα. Auch für die Mäuse mit SD konnte keine veränderte Phosphorylierung von PKCα durch I/R festgestellt werden. Innerhalb der Gruppe der HFD-Mäuse wurde eine geringfügig verringerte Phosphorylierung durch I/R festgestellt. Die Phosphorylierung der Position T172 durch AMPK ist in Abbildung 18 (B) gezeigt. HFD-Mäuse zeigten im Vergleich zu den SD-Mäusen eine verstärkte Phosphorylierung an Position T172. Durch den Einfluss von I/R zeigte sich hingegen eine verringerte Phosphorylierung der AMPK im EDL der SD-Mäuse. Ischämie und Reperfusion in den HFD-Mäusen zeigte sich wie auch bei den SD-Mäusen als Faktor, der zu einer verringerten Phosphorylierung durch AMPK beigetragen hat. Die Ergebnisse sind nicht statistisch signifikant.



Abb. 18: Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα und AMPK im M. extensor digitorum longus

Relative Phosphorylierung der Kinasen PKCα (A) und AMPK (B) für Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Angegeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe. Das Molekulargewicht (MW) für pPKC beträgt 77 kDa, für pAMPK 62 kDa.

3.6.3 Unverändertes T2/T1-Verhältnis durch den Einfluss *von high-fat diet* und I/R

Durch den Einfluss von HFD wurde im Vergleich mit den SD-Mäusen ein unverändertes T2/T1- Isoformverhältnis im EDL festgestellt. Das T2/T1- Isoformverhältnis zeigte auch durch den Einfluss von I/R keine Veränderung im EDL der SD-Mäuse. In der Gruppe der Mäuse mit HFD zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede der Titin-

Isoformzusammensetzung von T1 und T2 durch den Einfluss von I/R. Die Ergebnisse aus Abbildung 19 sind nicht statistisch signifikant.



Abb. 19: Titin Isoformverhältnis des *full-length* Titin (T1) zum spezifischen Abbauprodukt (T2) im M. extensor digitorum longus

T2/T1-Isoformverhältnis für Kontrolltiere mit Standarddiät (SD), für SD + Ischämie und Reperfusion (I/R), für *high-fat diet* (HFD) und HFD + I/R. Die repräsentativen Titinbanden (T1) mit Degradationsbanden (T2) sind für die jeweilige Kondition oberhalb des Balkendiagramms dargestellt. Angegeben werden die Mittelwerte ± Standardfehler bei n=4-6 Tieren pro Gruppe.

	<u>Psoas</u>				<u>TA</u>			EDL			
	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R		
РТ	↓*	↓*	^*	↑ *	↑*	→*	→*	↓*	↓*		
Fmax	↓*	↓*	1	→	\leftrightarrow	\downarrow	↓*	↓*	↓		
S12022	\leftrightarrow	↓*	1	\leftrightarrow	\rightarrow	\leftrightarrow	1	\leftrightarrow	\leftrightarrow		
S11878	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	→	\rightarrow	\downarrow	1	1	\leftrightarrow		
РКСа	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	1	\leftrightarrow	\leftrightarrow	↓		
AMPK	1	1	\downarrow	1	\leftrightarrow	1	\rightarrow	1	\downarrow		
T2/T1	1	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	↓*	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow		

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus Kraftmessungen und biochemischen Untersuchungen der drei Muskeln M. Psoas, TA und EDL

In den Zeilen ist die jeweilige Untersuchung aufgeführt. In den Spalten ist das Gewebe des entsprechenden Muskels zu finden. Der Pfeil nach oben (\uparrow) ist als Zunahme zu verstehen, der Pfeil nach unten (\downarrow) als Abnahme. Der horizontal in beide Richtungen zeigende Pfeil (\leftrightarrow) als unverändert. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Asterix (*) rechts vom Pfeil gekennzeichnet. Die Ergebnisse der erhobenen Daten sind Kapitel 3 zu entnehmen.

4 Diskussion

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass kardiale Ischämie und Reperfusion (I/R) zu einem raschen Anstieg der Titin-basierten passiven Steifigkeit (PT) von Herzmuskelzellen führt, der durch Phosphorylierung der PEVK-Region (S11878 und S12022) ausgelöst wird (Hidalgo et al. 2009). In diabetischen Herzen konnten Hopf et al. ebenfalls eine erhöhte Titin-basierte passive Steifigkeit nachweisen, einhergehend mit einer erhöhten Phosphorylierung am Serinrest 11878 (Hopf et al. 2018). Es ist jedoch wenig bekannt über die Veränderungen der Titin-basierten Steifigkeit und über die aktive Kraftentwicklung auf Ebene der Skelettmuskulatur bei Diabetes mellitus und kardialer I/R. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, ein tieferes Verständnis zu der Rolle von Titin zur kontraktilen Leistung der Skelettmuskulatur unter diabetischer Stoffwechsellage und kardialer I/R zu erhalten.

4.1 Der Einfluss von *high-fat diet* auf die kontraktile Funktion der Skelettmuskulatur

Bekannt ist, dass Typ-2 Diabetes in Patienten zu einer Muskelatrophie und einem fortschreitenden Verlust von Muskelkraft führen kann (Park et al. 2007; Perry et al. 2016). Wie und warum bei Typ-2 Diabetes die kontraktile Leistung der Skelettmuskulatur verändert ist, ist noch nicht umfassend verstanden und wird aktuell intensiv erforscht. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Titin die wesentliche Einflussgröße für die passive Spannung und aktive Kraftentwicklung in der Skelettmuskulatur ist (Horowits et al. 1986; Joumaa et al. 2008) und dass die Titin-basierte passive Kraft durch Ausdehnung der elastischen I-Bande erzeugt wird (Trombitás et al. 1998). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese verfolgt, dass *high-fat diet* die Titin-basierte kontraktile

Leistung der Skelettmuskulatur von C57BL/6J -Mäusen verändert. Die hier vorgestellten Ergebnisse der Kraftmessungen aus passiver Zugspannung und maximaler Ca²⁺induzierter Kraftentwicklung konnten die Hypothese bestätigen. *High-fat diet* führte zu einer signifikanten Verringerung der passiven Zugspannung (p<0,0001) und der maximalen Kraftentwicklung (p<0,001 für M. Psoas und p<0,01 für EDL) (Tabelle 12). Damit konnte eine Abnahme der kontraktilen Funktion skelettaler Muskelfasern in diabetischen Tieren gezeigt werden. Wie schon zuvor beschrieben, stellt Titin die wesentliche Einflussgröße für die passive Spannung im Skelettmuskel dar und wirkt hierüber modulierend auf die maximale Kraftentwicklung. Daher lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass *high-fat diet* die Titin-basierte kontraktile Leistung der Skelettmuskulatur einschränkt. Eine Ausnahme stellt der M. tibialis anterior dar. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte passive Spannung, aber keine Veränderung der maximalen Kraftentwicklung durch *high-fat diet*.

Mit den Ergebnissen wird erstmals die Korrelation von reduzierter passiver Spannung und reduzierter aktiver Kraftentwicklung in der Skelettmuskulatur aufgezeigt. Cazorla et al. konnten die gleiche Korrelation in einer früheren Studie an Ratten-Kardiomyozyten zeigen. Als möglichen zugrundeliegenden Mechanismus führten Cazorla et al. auf, dass eine längenabhängige Ca²⁺-Sensibilisierung zum Teil durch Veränderungen der passiven Kraft vermittelt wird, und Titin als Sensor die Länge des Sarkomers moduliert, wodurch die kontraktilen Proteine für Ca²⁺ sensibilisiert werden (Cazorla et al. 1999).

Die drei untersuchten Muskeln, M. Psoas, EDL und TA, besitzen alle zum Großteil Typ IIB Fasern und sind daher als schnell-zuckende glykolytische Muskeln zu klassifizieren, wobei der M. Psoas mit einem Anteil von 24,3% Typ IIA Fasern auch Anteile des schnellzuckenden oxidativ-glykolytischen Muskelmetabolismus aufweist (Augusto et al. 2017; Vlahovic et al. 2017). Ob in dem Muskelgewebe der hier verwendeten C57BL/6J -Mäuse eine HFD-bedingte Veränderung der Fasertypverteilung stattgefunden hat, wurde bisher nicht untersucht und müsste in weiteren Experimenten analysiert werden. Die Ergebnisse aus früheren Studien zeigen jedoch eine veränderte Fasertypverteilung im Skelettmuskel von Diabetes Typ 2 Patienten. Oberbach et al. konnten eine signifikante Verringerung der langsamen oxidativen Typ I Fasern und einen deutlichen Anstieg des Anteils der schnellen glykolytischen Typ II Fasern feststellen (Oberbach et al. 2006). In einer Studie, die ebenfalls die Faserverteilung von Typ 2 Diabetes Patienten untersuchte, wurden die Ergebnisse jedoch nicht bestätigt (He et al. 2001). Jedoch wurde in der Studie von He at al. herausgefunden, dass der Lipidgehalt im Muskelgewebe von adipösen Patienten und Typ2 Diabetikern um 40-50% höher war als in den Skelettmuskeln von normalgewichtigen Patienten (He et al. 2001). Die Ergebnisse stützen die makroskopischen Beobachtungen, die bei der Präparation der Muskelfasern in der vorliegenden Studie gemacht wurden. Dahingehend wäre eine Untersuchung des Lipidgehalts der verwendeten Muskelproben aufschlussreich und könnte eine weitere Erklärung bieten für die Unterschiede von M. Psoas und EDL zum TA. Einen weiteren Hinweis für die veränderte kontraktile Leistung der Skelettmuskulatur durch high-fat diet liefern Vorarbeiten von Prado et al. (2005). Hier wurde eine Korrelation zwischen der Größe der Titin-Isoform und der Titin-basierten Steifigkeit festgestellt. Die Ergebnisse von Prado et al. deuten darauf hin, dass vor allem langsame oxidative Muskeln lange Titin-Isoformen und eine geringe Titin-basierte Steifigkeit aufweisen, wohingegen schnelle glykolytische Muskeln lange oder kurze Titin-Isoformen exprimieren und in ihrer passiven Steifigkeit stark variieren (Prado et al. 2005). Wie Abbildung 11, 15 und 19 zeigen, konnte keine Veränderung der Titin-Isoformen festgestellt werden. Somit würde nachfolgend eine Bestimmung der Faserverteilung Aufschluss geben über mögliche muskelspezifische Anpassungen durch high-fat diet.

	<u>Psoas</u>			<u>TA</u>			EDL		
	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R
РТ	↓*	↓*	↑ *	↑ *	↑*	↓*	↓*	↓*	↓*
Fmax	↓*	↓*	Ť	\downarrow	\leftrightarrow	\downarrow	↓*	↓*	↓

Tabelle 12: Tabellarische Übersicht der Veränderungen von passiver Spannung (PT) und maximaler Ca²⁺⁻abhängiger Kraftentwicklung (Fmax) im Vergleich zu Tieren unter Standarddiät und ohne I/R. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den drei Muskeln M. Psoas, TA und EDL.

Der Pfeil nach oben (\uparrow) ist als Zunahme zu verstehen, der Pfeil nach unten (\downarrow) als Abnahme. Der horizontal in beide Richtungen zeigende Pfeil (\leftrightarrow) als unverändert. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Asterix (*) gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *two-way* ANOVA ermittelt und bei p<0,05 mit einem Asterisk (*) p<0,01 akzeptiert. Die Ergebnisse der erhobenen Daten sind Kapitel 3 zu entnehmen.

4.2 Der Einfluss von kardialer I/R auf die kontraktile Funktion der Skelettmuskulatur

Untersuchungen an Skelettmuskeln von Ratten, an denen 12 Wochen nach kardialer Ischämie Kraftmessungen durchgeführt wurden, zeigten veränderte kontraktile Leistungen. Neben einer signifikanten Verringerung der aktiven Kraftentwicklung, wurde eine Einschränkung der Kontraktions- und Relaxationskinetik, respektive eine signifikante Verringerung der An- und Entspannungsrate in den Ratten 12 Wochen nach kardialer Ischämie festgestellt (Williams und Ward 1998). Frühe Einflüsse nach Myokardinfarkt auf die kontraktile Leistung von Herzmuskelzellen konnten Kötter et al. in Experimenten an Mäusen feststellen. So waren bereits wenige Stunden nach Myokardinfarkt Veränderungen am Sarkomerprotein Titin nachweisbar, die maßgeblich zu einer erhöhten passiven Steifigkeit der Herzmuskelzellen beitragen. Kötter et al. kamen zu dem Schluss, dass die Titin-basierte Erhöhung der Steifigkeit, ein Mechanismus der Herzmuskelzellen ist, um sich den veränderten mechanischen Anforderungen nach Herzmuskelschaden anzupassen (Kötter et al. 2016). Auf den Erkenntnissen aufbauend verfolgt die vorliegende Studie die Hypothese, dass auch die Skelettmuskulatur durch Titin-basierte Anpassungsmechanismen eine veränderte kontraktile Kraftentwicklung nach kardialer Ischämie aufweist. Um die genannte Hypothese zu überprüfen, wurden die passive Spannung und die Ca²⁺-induzierte aktive Kraftentwicklung der Skelettmuskulatur von Mäusen nach kardialer Ischämie und Reperfusion gemessen. Die Ergebnisse haben deutliche, wenn auch stark muskelabhängige Veränderungen durch high-fat diet und I/R gezeigt.

Im M. Psoas und im EDL führten Ischämie und Reperfusion zu einer verringerten passiven Spannung und verringerten maximalen Kraftentwicklung in den Tieren mit Standarddiät. Somit scheint I/R im Skelettmuskel, anders als im Herzen, eher zu einer Abnahme der passiven Spannung zu führen. Im *high-fat diet* -Skelettmuskel wurde die bereits verringerte passive Spannung und maximale Kraftentwicklung (Kapitel 4.1) durch Ischämie und Reperfusion tendenziell noch weiter verringert. Jedoch wurde die passive Spannung im *high-fat diet* -M. Psoas durch I/R signifikant erhöht. Somit lässt sich vermuten, dass die absoluten Auswirkungen von *high-fat diet*, I/R und *high-fat diet* + I/R auf die Muskelfunktionsparameter PT und Fmax sehr vom Muskeltyp abhängig sind. Welche Anpassungen oder Kompensationsmechanismen zu den muskelabhängigen Veränderungen geführt haben, bleibt zunächst unklar. Die Ursachen für die

muskelabhängigen Veränderungen könnten eine modifizierte Faserzusammensetzung und ein veränderter Metabolismus sein. Auffällig ist die deutlich niedrigere passive Spannung des TA in den Mäusen mit Standarddiät. Diese Beobachtung zeigte sich auch in der maximalen Ca²⁺-induzierten Kraftentwicklung des TA (Abb. 12). Vergleicht man die Kontrollgruppe (Standarddiät, ohne Einfluss von high-fat diet und I/R) der drei untersuchten Muskeln hinsichtlich maximaler Kraftentwicklung miteinander, so zeigte sich für den TA eine zwei- bis zweieinhalbfach niedrigere maximale Kraftentwicklung. Die passive Spannung des TA ist in der Kontrollgruppe verglichen mit dem M. Psoas und dem EDL sogar um das Drei- bis Fünffache niedriger. Warum diese deutlichen Unterschiede der PT und Fmax, vor allem in den strukturell und funktionell sehr ähnlichen Muskeln TA und EDL vorhanden sind, bleibt offen. Diese Erkenntnis unterstreicht jedoch die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen für eine umfassende Interpretation der Daten. Sinnvoll wären hier zum einen die Untersuchung der Faserzusammensetzung und der MHC-Isoformen und zum anderen das Muskelgewicht, bezogen auf das Körpergewicht der verwendeten Mäuse. Auch der Lipidgehalt der Muskulatur unter Standardbedingungen und unter dem Einfluss von high-fat diet und I/R wäre weiterführend und aufschlussreich. Interessant wäre zudem eine Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress, um weitere Faktoren zu identifizieren, die zu möglichen Modifikationen der passiven Spannung beigetragen haben. Ein erhöhtes oxidatives Stresslevel in Diabetespatienten wurde bereits in früheren Studien festgestellt (Rehman und Akash 2017) und führte durch posttranslationale Modifikationen (S-Gluthathionylierung und Arginylierung) zu einem Stabilitätsverlust von Titin und damit zu einer verringerten passiven Spannung (Alegre-Cebollada et al. 2014; Leite et al. 2016). Auch im high-fat diet Modell von Mäusen konnten erhöhte oxidative Stresslevel nachgewiesen werden (Furukawa et al. 2004). Die erhöhten Fettsäurespiegel im high-fat diet -Modell der Mäuse verstärkten die Aktivität der NADPH-Oxidase und erhöhten dadurch den oxidativen Stress mit dysregulierter Produktion von Zytokinen wie Adiponectin und IL-6. Begleitend dazu konnten nach Behandlung mit einem NADPH-Oxidase-Inhibitor reduzierte oxidative Stresslevel festgestellt werden (Furukawa et al. 2004).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Titin-basierte kontraktile Funktion der Skelettmuskulatur durch *high-fat diet* beeinträchtigt wurde. Umbau- und Anpassungsprozesse *im high-fat diet* Muskel führten zu einem weniger steifen Titin und daraus resultierend zu einer verringerten passiven Spannung und verringerten maximalen Kraftentwicklung. Ischämie und Reperfusion verstärkten die Beeinträchtigung der (Titinbasierten) kontraktilen Funktion im *high-fat diet* - und im Standarddiät-Skelettmuskel.

4.3 Posttranslationale Modifikationen von Titin in *high-fat diet* Mäusen und Mäusen mit kardialer I/R

Die Phosphorylierung des Sarkomerproteins Titin ist eine wichtige posttranslationale Modifikation und reguliert maßgeblich die passive Steifigkeit von Titin (Hidalgo und Granzier 2013). Frühere Studien haben gezeigt, dass die Charakteristiken von high-fat diet Mäusen ein geeignetes Modell für einen frühen Zeitpunkt des Typ2-Diabetes darstellen (Winzell und Ahrén 2004). Zudem zeigten sich C57BL/6J -Mäuse als am effizientesten im Vergleich zu anderen Stämmen (Surwit et al. 1995). Vorangegangene Studien an der Herzmuskulatur aus Diabetes Patienten und diabetischen Tiermodellen hatten deutliche Änderungen in der posttranslationalen Modifikation von Titin gezeigt, insbesondere eine der PKC-abhängigen Hyperphosphorylierung Phosphorylierungsstellen S11878 und S12022 im I-Band von Titin, welches maßgeblich die passiven Eigenschaften des Moleküls vermittelt (Hopf et al. 2018; Funk et al. 2022). Die Hyperphosphorylierung korrelierte mit einer gesteigerten passiven Spannung der Kardiomyozten (Hopf et al. 2018). Weiterhin untersuchte Hopf et al. humane Kardiomyozyten und führte die gesteigerte Phosphorylierung an S11878 auf eine gesteigerte Aktivität der PKCa zurück (Hopf et al. 2018). Inwiefern eine diabetische Stoffwechsellage auch zu posttranslationalen Modifikationen von Titin in Skelettmuskeln führt, wurde bislang nicht untersucht. In der vorliegenden Studie führte high-fat diet bei Mäusen im M. Psoas zu einer verringerten Phosphorylierung an Titin S12022 (p<0,01). Im TA und im EDL waren die beobachteten Änderungen im Phosphorylierungslevel von S12022 nicht statistisch signifikant und wurden daher als unverändert gewertet. Auch am Serinrest 11878, der ebenfalls PKC-abhängig phosphoryliert werden kann, führte highfat diet nicht zu signifikanten Änderungen. Anders als bei Hopf et al. wurden in der vorliegenden Studie keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen veränderter passiver Spannung und Phosphorylierungsänderungen der PKC-sensitiven Serinreste im I-Band Titin festgestellt. Auch die Aktivität der PKCa zeigte in keiner der Versuchsgruppen signifikante Veränderungen. Zusätzlich zum Vergleich der Modelle Standarddiät versus high-fat diet wurden die posttranslationalen Modifikationen von Titin unter dem Einfluss von kardialer I/R auf die zwei Modelle (SD und high-fat diet) untersucht. Hintergrund ist, dass kontraktile und regulatorische Proteine wie Titin einen wesentlichen Einfluss auf die Herzleistung und die Anpassung an pathologische Zustände im Herzen haben. Beim Isoformen-Switch der elastischen I-Bande kann die passive Steifigkeit mittelfristig angepasst werden (Prado et al. 2005). Eine kurzfristige, dynamischere Anpassung der passiven Steifigkeit und damit einhergehend, eine Anpassung an pathologische Herz-Kreislaufzustände erfolgt durch posttranslationale Modifikationen der elastischen I-Bande. Durch Phosphorylierung an der kardialen Isoform N2B(us) und der PEVK-Region (kardial und skelettal) kann die kontraktile Leistung dynamisch moduliert werden (Krüger und Kötter 2016). Kötter et al. zeigten an Kardiomyozyten von C57BL/6J -Mäusen, dass kardiale I/R zu einer signifikanten Hyperphosphorylierung der Serinreste S12022 und S11878 führt. Zusätzlich wurde eine erhöhte Kinaseaktivität der PKCa gemessen, die den Serinrest S11878 als Target phosphoryliert (Kötter et al. 2016). Darüber hinaus zeigten Forschungen unserer Arbeitsgruppe an Kardiomyozyten von Mäusen nach kardialer I/R, dass auch im nicht-infarzierten Teil des Herzens (Remote-Myokard) posttranslationale Modifikationen stattfinden (Funk et al. 2022). An der Stelle S11878 Remote-Myokards I/R-Mäuse wurde eine des der signifikante Hyperphosphorylierung festgestellt, was wiederum folgern lässt, dass posttranslationale Modifikationen durch kardiale I/R nicht nur das infarzierte Areal betreffen (Funk et al. 2022). Ob folglich neben den Änderungen am Herzen, auch Veränderungen der Titinmodifikation an der Skelettmuskulatur stattfinden, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Basierend auf den vorangegangenen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass kardiale I/R durch posttranslationale Modifikationen zu einer dynamischen Modifikation des skelettalen Titins führt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten durch kardiale I/R überwiegend unveränderte Phosphorylierungen an der skelettalen PEVK-Region (S12022 und S11878). PKCa blieb im SD+I/R Modell für alle drei untersuchten Muskeln unverändert. Somit können die von Kötter et al. erhobenen Erkenntnisse einer korrelierenden PKCα-Aktivität zur Phosphorylierung an den Serinresten S12022 und S11878 in Titins PEVK-Region in der vorliegenden Studie nicht auf den Skelettmuskel übertragen werden. Auch im high-fat diet -Skelettmuskel wurde eine überwiegend unveränderte Phosphorylierung der skelettalen PEVK-Region (S12022 und S11878) durch kardiale I/R beobachtet. Auch die relative Phosphorylierung der PKCa zeigte im high-fat diet +I/R Modell keine statistisch signifikanten muskelspezifischen Veränderungen (Tab. 13). Somit lässt sich aus den
Ergebnissen der vorliegenden Studie keine Erklärung für die veränderte passive Titinvermittelte Steifigkeit der Myofilamente ableiten.

Durch in-vitro Phosphorylierungen und Massenspektrometrie wurde festgestellt, dass die PEVK-Region primär durch PKCa phosphoryliert wird (Hidalgo et al. 2009). Die relativen Phosphorylierungslevel von PKCa an T497 blieben in dieser Arbeit jedoch durch den Einfluss von high-fat diet und im SD+I/R-Modell für den M. Psoas, EDL und TA unverändert. Im high-fat diet +I/R Modell veränderte sich die relative Phosphorylierung muskelspezifisch ohne statistische Signifikanz. Dass eine gesteigerte Kinaseaktivität anderer PKC-Isoformen ein Grund für die teils muskelspezifischen Veränderungen an Titins Serinresten S12022 und S11878 ist, konnte in einer Studie von Hidalgo et al. weitestgehend ausgeschlossen werden. Da PKCa häufig nur schnell vermittelte Effekte auf die Phosphorylierung zeigt, besteht die Möglichkeit, dass die initiale Antwort durch PKCa vermittelt wurde, die Änderung in der Aktivität der Kinase aber zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mehr nachweisbar war. Denkbar ist auch eine Veränderung in der Phosphatase-Aktivität, die, wenn sie verringert wäre, zu einer verlängerten Phosphorylierung der Substrate beitragen könnte. Basierend auf Studien von Kötter et al. und Hidalgo et al. wäre eine veränderte Kinaseaktivität der PKCa in Korrelation zu den veränderten Phosphorylierungen der Serinreste S12022 und S11878 zu erwarten gewesen. Grundlage dessen sind posttranslationale Modifikationen unter pathologischen Herz- und Kreislaufzuständen und Stoffwechselerkrankungen. Die Korrelation zwischen PKCa und der PEVK-Region (S12022 und S11878) konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die high-fat diet bedingten veränderten Phosphorylierungslevel an den Substraten S12022 und S11878 könnte die Analyse der CaMKIIô-Aktivität sein, da diese ebenfalls die PEVK-Region im Skelettmuskel phosphorylieren kann (Hidalgo et al. 2013; Müller et al. 2014). Beachtenswert wäre auch eine Untersuchung der Konzentration des Zytokins IL-6. Wie schon in Kapitel 4.2 erwähnt, wurde durch Furukawa et al. im high-fat diet Muskel eine dysregulierte Produktion von Zytokinen wie IL-6 beobachtet (Furukawa et al. 2004). Kötter et al. stellten an kardialem Titin fest, dass IL-6 zu einem Anstieg der PKCa-Phosphorylierung führt und damit zu einer verstärkten Phosphorylierung der kardialen PEVK-Region von Titin (Kötter et al. 2016). Auch im Skelettmuskel besitzt IL-6 eine zentrale Rolle und dient unter anderem als Regulator des Energiestoffwechsels (Muñoz-Cánoves et al. 2013). Somit ist eine Beeinflussung der PKCa-Phosphorylierung und damit auch der skelettalen PEVK-Region von Titin durchaus denkbar, und dahingehend wäre eine Bestimmung der IL-6 Konzentration unter pathologischen Zuständen (*high-fat diet* und I/R) interessant und aufschlussreich.

Zusammengefasst konnte keine I/R bedingte Veränderung der posttranslationalen Modifikation an Titins skelettaler PEVK-Region festgestellt werden. Auch die Aktivität von PKC α lieferte keine Erkenntnisse, die eine ausbleibende Modifikation erklären. *High-fat diet* führte an S12022 tendenziell zu einer verringerten Phosphorylierung und zeigte an S11878 eher muskelspezifische Veränderungen, die bei unveränderter PKC α -Aktivität den Blick auf andere Kinasen oder Zytokine lenken.

	<u>Psoas</u>			TA			EDL		
	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R
S12022	\leftrightarrow	↓*	↑	\leftrightarrow	↓	\leftrightarrow	1	\leftrightarrow	\leftrightarrow
S11878	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	↓	↓	\downarrow	1	1	\leftrightarrow
РКСа	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	1	\leftrightarrow	\leftrightarrow	↓

Tabelle 13: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den biochemischen Untersuchungen der drei Muskeln M. Psoas, TA und EDL

In den Zeilen ist die jeweilige Untersuchung aufgeführt. In den Spalten ist das Gewebe des entsprechenden Muskels zu finden. Der Pfeil nach oben (\uparrow) ist als Zunahme zu verstehen, der Pfeil nach unten (\downarrow) als Abnahme. Der horizontal in beide Richtungen zeigende Pfeil (\leftrightarrow) als unverändert. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Asterix (*) rechts vom Pfeil gekennzeichnet. Die Ergebnisse der erhobenen Daten sind Kapitel 3 zu entnehmen.

4.4 Titindegradation durch HFD und kardialer I/R

Aufgrund seiner hohen molekularen Masse und der konstanten mechanischen Belastung im arbeitenden Sarkomer ist das Filamentprotein Titin einer konstanten Protein-Qualitätskontrolle unterworfen und besonders disponiert für die Degradation unter pathologischen Stoffwechselzuständen. Unter ischämischen Bedingungen wird Titin als eines der ersten Myofilamentproteine abgebaut (Hein et al. 1994). Des Weiteren ist aus vorangegangenen Studien bekannt, dass Insulinmangel und Insulinresistenz, wie sie auch im hier untersuchten *high-fat diet* -Modell vorliegen, einen erhöhten Proteinabbau zu Folge haben. Im insulinopenischen Skelettmuskel ist der erhöhte Abbau mit einer Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom Systems verbunden (Hu et al. 2008). Die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) kann durch posttranslationale Modifikation die Transkription der E3-Ligase regulieren und damit verbunden den Proteinabbau verstärken (Carling 2004; Kjøbsted et al. 2018) und wird daher häufig als Markerprotein für die Regulation des Stoffwechsels und der Autophagie verwendet (Garcia und Shaw 2017; Kjøbsted et al. 2018).

Kötter et al. zeigten bereits, dass in Herzmuskelzellen drei Tage nach einem Myokardinfarkt eine erhöhte myokardiale Steifigkeit mit verstärkter Titindegradation und ein erhöhtes Auftreten des spezifischen Abbauproduktes von Titin (T2) vorlag (Kötter et al. 2016). Da die Auswirkungen von *high-fat diet* und I/R auf den Titinabbau in der Skelettmuskulatur bisher unzureichend untersucht sind, wurde in der Arbeit zum einen das Titin-Isoformverhältnis (T2/T1-Ratio) untersucht und zum anderen die relativen Phosphorylierungslevel von AMPK. Die Experimente verfolgten basierend auf den oben genannten Vorarbeiten die Hypothese, dass Diabetes und I/R die Autophagieprozesse verstärken und damit zu einem erhöhten Abbau von Titin in der Skelettmuskulatur führen.

	<u>Psoas</u>			<u>TA</u>			EDL		
	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R	SD+I/R	HFD	HFD+I/R
AMPK	1	1	\downarrow	1	\leftrightarrow	1	\downarrow	1	\downarrow
T2/T1	1	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	↓*	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow

Tabelle 14: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den biochemischenUntersuchungen der drei Muskeln M. Psoas, TA und EDL

In den Zeilen ist die jeweilige Untersuchung aufgeführt. In den Spalten ist das Gewebe des entsprechenden Muskels zu finden. Der Pfeil nach oben (\uparrow) ist als Zunahme zu verstehen, der Pfeil nach unten (\downarrow) als Abnahme. Der horizontal in beide Richtungen zeigende Pfeil (\leftrightarrow) als unverändert. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Asterix rechts vom Pfeil gekennzeichnet. Die Ergebnisse der erhobenen Daten sind Kapitel 3 zu entnehmen.

High-fat diet führte im M. Psoas und im EDL zu einer tendenziell gesteigerten Aktivierung der AMPK, die durch I/R dann tendenziell reduziert wurde. Somit lässt sich für den M. Psoas und den EDL nur vermuten, dass durch Ischämie und Reperfusion Kompensationsmechanismen induziert wurden, die den diabetischen Skelettmuskel vor überschießenden Autophagieprozessen schützen könnten. Im *high-fat diet* TA wurden die protektiven Prozesse durch I/R auf die Autophagie nicht beobachtet. Wichtig ist jedoch, dass im TA auch keine erhöhte AMPK-Aktivität durch *high-fat diet* festgestellt wurde, die ein Trigger für eine I/R bedingte Kompensation sein könnte. Betrachtet man die Auswirkung von I/R auf die AMPK-Aktivierung der Kontrolltiere (SD), so zeigt sich für den M. Psoas und den TA eine gesteigerte AMPK-Aktivierung, für den EDL eine verringerte AMPK-Aktivität. Es wäre daher denkbar, dass im diabetischen Skelettmuskel schützende Kompensationsmechanismen initiiert wurden, die durch den Einfluss von I/R dann getriggert wurden. Donlin et al. konnten einen Komplex identifizieren, der mit Titins N2A-Domäne und zwei Proteinen (Smyd2 und Hsp90) interagiert und Titin so vor dem Abbau schützen kann (Donlin et al. 2012).

Es liegt der Vermutung nahe, dass die schützenden Mechanismen wie Titin Stabilisierung durch Smyd2-verbundende Methylierung des Hsp90 im diabetischen Skelettmuskel der Kontrolltiere nicht ausgebildet wurden, oder dass I/R muskelspezifisch zu einer Aktivierung bzw. Deaktivierung von Smyd2 geführt hat. In der Studie von Munkanatta Godage et al. wurde die protektive Rolle von Smyd2 an der N2A Region von Titin gezeigt. Gereinigtes Smyd2 wurde dem Verdauungspuffer beigefügt und durch die Zugabe von N2A und Proteasen wurde die Reaktion initiiert. Festgestellt wurde der schützende Effekt von Smyd2 auf den proteasomalen Abbau von Titins N2A (Munkanatta Godage, Dhanushka N. P. et al. 2018). Des Weiteren wurde eine Destabilisierung der Muskelfunktion durch I/R-bedingte Inaktivierung von Smyd2 nachgewiesen (Munkanatta Godage, Dhanushka N. P. et al. 2018). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Smyd2 für die Stabilität von Titin und die Funktion der Skelettmuskulatur wichtig ist, da sein Mangel zu eingeschränkter Mobilität und Kontraktilität führt (Donlin et al. 2012). In der vorliegenden Studie wurde im diabetischen Skelettmuskel eine erhöhte AMPK-Aktivität festgestellt, die nach kardialer I/R verringert wurde. Möglich also, dass kardiale I/R durch die verstärkte AMPK-Aktivität getriggert wurde, um die damit einhergehende verstärkte Autophagie zu drosseln. Dahingehend wäre eine Untersuchung der Smyd2-Aktivität im diabetischen und im I/R-Skelettmuskel aufschlussreich. Die Ergebnisse der T2/T1-Ratio aus der vorliegenden Studie zeigen keinen Einfluss von high-fat diet auf die Titindegradation in der Skelettmuskulatur. Auch im Skelettmuskel nach Standarddiät wurde durch I/R keine signifikant veränderte Titindegradation festgestellt. Im high-fat diet Skelettmuskel wurde durch kardiale I/R ein signifikant verringerter T2/T1 Turnover im TA festgestellt. Im M. Psoas und im EDL zeigte sich kein veränderter Titin Turnover. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der T2-Bande das Cronos Titin ist. Cronos ist eine kürzlich entdeckte Isoform von Titin, die an einem anderen Promoter erzeugt wird und ebenfalls in der Z-Scheibe lokalisiert ist. Cronos Titin ist vor allem in schnell-zuckenden Skelettmuskelfasern vorhanden, und erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cronos Titin unter pathologischen Zuständen das Sarkomer stabilisieren kann (Swist et al. 2020). Ob Cronos Titin hier eine Rolle in der Sarkomerstabilität eingenommen hat, bleibt unklar und müsste in weiteren Untersuchungen festgestellt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *high-fat diet* die AMPK-Aktivität erhöht und somit zu einer verstärkten Autophagie im Skelettmuskel führen könnte. Kardiale I/R führte im nicht-diabetischen Skelettmuskel auch zu einer Steigerung der AMPK-Aktivität und damit vermutlich zu einer erhöhten Autophagie. Im diabetischen Skelettmuskel wurde die durch *high-fat diet* erhöhte AMPK-Aktivität unter dem Einfluss von kardialer I/R verringert. Der Titin-Turnover blieb, bis auf eine muskelspezifische Verringerung im TA, unverändert.

Wie schon in Kapitel 1.1.4 erläutert, führt ein Diabetes mellitus zu einer fortschreitenden Atrophie der Skelettmuskulatur. Ischämie und Reperfusion führten im Skelettmuskel zu einer mitochondrialen Schädigung und einem gestörten Muskelmetabolismus (siehe dazu Kapitel 1.2.2). Die in dieser Studie erhöhte AMPK-Aktivierung im diabetischen Skelettmuskel kann somit als Kompensationsmechanismus verstanden werden, um einen fortschreitenden Verlust an Muskelmasse und Muskelkraft vorzubeugen. Die Hochregulierung von AMPK und damit die verstärkte Autophagie könnte somit ein Versuch sein, der zellulären Homöostase im geschädigten Skelettmuskel und der myofibrillären Atrophie entgegenzuwirken. Entgegen der hier festgestellten erhöhten Aktivierung von AMPK wurde in in-vivo Studien eine unveränderte AMPK-Aktivität in Übergewichtigen und Typ-2 Diabetikern festgestellt (Steinberg et al. 2004).

4.5 Limitationen

In diesem Abschnitt beleuchte ich die Einschränkungen dieser Arbeit, um eine Einschätzung über die Qualität und Aussagekraft der vorliegenden Studie vorzunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurden maximal 6 Versuchstiere für jeden Ansatz verwendet. Eine größere Stichprobe würde noch präzisere Ergebnisse liefern, jedoch sollte hier stets eine Abwägung zwischen Kosten und Nutzen der Tierversuche getroffen werden. Ein weiterer limitierender und interessanter Faktor ist die Bestimmung des Muskelgewichts des jeweilig untersuchten Muskels (M. Psoas, M. tibialis anterior, M. extensor digitorum longus). Zum einen war die feine Präparation der Muskulatur aus dem Situs der Maus sehr herausfordernd, zum anderen war eine umgehende Fixierung des Muskelgewebes in Stickstoff notwendig. Nichtsdestotrotz hätte mit Bestimmung des Muskelgewichts bezogen auf das Körpergewicht der Maus eine Aussage darüber getroffen werden können, ob eine Muskelatrophie unter prädiabetischen Bedingungen vorliegt. Des Weiteren zeigen sich in der vorliegenden Arbeit teils muskelspezifische Veränderung, die durch eine Bestimmung der Fasertypen und der MHC-Isoformen weitergehende Rückschlüsse erlauben würden. Denkbar ist eine Veränderung der MHC-Isoformzusammensetzung unter Ischämie und Reperfusion wie auch eine Veränderung der Isoformzusammensetzung und prädiabetischen Bedingungen. Grundlegend stellt die Analyse des bis zu 3,8 MDa großen Titin auch eine methodische Herausforderung dar. So ist das Western-Blot Verfahren wie auch die Weiterverarbeitung mit phosphospezifischen Antikörpern teils sehr schwierig und benötigt mehrere Durchläufe, bis eine verwertbare Bande zu sehen ist.

4.6 Schlussfolgerung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der kontraktilen Funktion im diabetischen Skelettmuskel und nach kardialer I/R. Zusammenfassend konnte überwiegend eine Abnahme der passiven Spannung durch kardiale I/R festgestellt werden. Die Veränderungen sind jedoch muskelabhängig. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine signifikante Änderung der passiven Spannung mit einer signifikanten Änderung der maximalen Kraftentwicklung assoziiert war. Darüber hinaus führten high-fat diet und I/R zu ähnlichen Veränderungen der passiven Spannung und der Fmax in den drei untersuchten Muskeln. Eine mögliche Erklärung könnte ein erhöhter oxidativer Stress oder der Einfluss von Zytokinen wie IL-6 sein. Die Effekte von high-fat diet und + I/R zeigten muskelabhängige Veränderungen der Titin-basierten kontraktilen Funktion. Mögliche Ursachen für die muskelabhängigen Veränderungen der passiven Spannung und der maximalen Kraftentwicklung könnten eine unterschiedliche Faserzusammensetzung sein. Auch ein veränderter Stoffwechsel als Anpassung an veränderte pathologische Zustände im Muskel, wie Lipidakkumulation und erhöhter oxidativer Stress, ist denkbar. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Vermutung zu, dass die verminderte passive Spannung im diabetischen Skelettmuskel +/- I/R als Anpassungsmechanismus zum Schutz vor langfristigen Sarkomerschäden verstanden werden kann. Die daraus resultierende reduzierte mechanische Belastung könnte ein Versuch sein, die Funktionalität der Skelettmuskulatur zu erhalten. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die kontraktile Funktion der Skelettmuskulatur unmittelbar postischämisch sowie langfristig nach Ischämie und Reperfusion zu untersuchen. Die hier untersuchten Skelettmuskelproben wurden 21 Tage nach Ischämie entnommen und untersucht.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zum einen den Einfluss kardialer Ischämie und Reperfusion im *high-fat diet* Skelettmuskel auf die posttranslationalen Modifikationen in Titins elastischer I-Bande zu untersuchen. Schlussendlich konnte kein signifikanter Einfluss von kardialer Ischämie und Reperfusion auf die posttranslationalen Modifikationen an Titins skelettaler PEVK-Region festgestellt werden. *High-fat diet* zeigte am Serinrest S11878 muskelspezifische Veränderungen und an S12022 eine tendenziell verringerte Phosphorylierung bei unveränderter Aktivität der PKCα. Aufschlussreich wäre daher die Untersuchung des Zytokins IL-6. Im pathologischen Metabolismus unterliegt IL-6 einer dysregulierten Produktion und führt dadurch zu einer raschen Aktivitätssteigerung der PKCα. Von weiterem Interesse ist zudem die Analyse der CaMKIIδ, die ebenfalls als Kinase die PEVK-Region phosphorylieren kann.

Abschließendes Ziel war es, das spezifische Abbauprodukt von Titin und die Aktivität der AMPK mit Blick auf verstärkte Abbauprozesse unter kardialer I/R und *high-fat diet* zu untersuchen. Beobachtet wurde eine erhöhte Aktivität der AMPK durch *high-fat diet* und auch durch kardiale I/R. Interessanterweise wurde die AMPK-Aktivität im *high-fat diet diet* Muskel dann durch kardiale I/R wieder verringert. Der Titin-Turnover blieb bis auf eine muskelspezifische Veränderung unverändert. Somit kann angenommen werden, dass *high-fat diet* und I/R zu einer verstärkten Autophagie im Skelettmuskel führen und zudem, dass im *high-fat diet* -Skelettmuskel Kompensationen stattfinden, die zu einer verringerten Aktivität der AMPK nach I/R führen.

Übergeordnet lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass sich die Titin-basierte Skelettmuskelfunktion funktionell an pathologische Zustände wie Diabetes und kardiale Ischämie anpasst, um langfristigen Folgeschäden vorzubeugen. Insofern ist auch in der festgestellten Erhöhung der AMPK im diabetischen Skelettmuskel ein Kompensationsmechanismus erkennbar, der zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und zur Verhinderung der myofibrillären Atrophie verstanden werden kann. Mit dem Wissen um die verringerte Muskelkraft und Muskelatrophie in diabetischen Patienten lassen sich aus den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit perspektivisch therapeutische Targets ableiten und die Folgeerkrankungen von Diabetes und Myokardinfarkt besser therapieren.

Literaturverzeichnis

- Aguiree, Florencia/Brown, Alex/Cho, Nam Ho/Dahlquist, Gisela/Dodd, Sheree/Dunning, Trisha/Hirst, Michael/Hwang, Christopher/Magliano, Dianna/Patterson, Chris (2013). IDF diabetes atlas. 29302298.
- Alegre-Cebollada, Jorge/Kosuri, Pallav/Giganti, David/Eckels, Edward/Rivas-Pardo, Jaime Andrés/Hamdani, Nazha/Warren, Chad M./Solaro, R. John/Linke, Wolfgang A./Fernández, Julio M. (2014). S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. Cell 156 (6), 1235–1246. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.056.
- Attaix, Didier/Taillandier, Daniel (1998). The Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Muscle Wasting in Comparison to Lysosomal and Ca2+-Dependent Systems. Advances in Molecular and Cell Biology 27, 235–266. https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60463-4.
- Augusto, Valéria/Padovani, Carlos Roberto/Campos, Gerson Eduardo Rocha (2017).
 SKELETAL MUSCLE FIBER TYPES IN C57BL6J MICE. Journal of Morphological Sciences 21 (2), 0 - 0-0. Online verfügbar unter http://www.jms.periodikos.com.br/journal/jms/article/587cb4537f8c9d0d058b45e a.
- 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. Circulation research 89 (11), 1065–1072. https://doi.org/10.1161/hh2301.100981.
- Bang, Marie-Louise/Gu, Yusu/Dalton, Nancy D./Peterson, Kirk L./Chien, Kenneth R./Chen, Ju (2014). The muscle ankyrin repeat proteins CARP, Ankrd2, and DARP are not essential for normal cardiac development and function at basal conditions and in response to pressure overload. PloS one 9 (4), e93638. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093638.
- Barash, Ilona A./Bang, Marie-Louise/Mathew, Liby/Greaser, Marion L./Chen, Ju/Lieber, Richard L. (2007). Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. American journal of physiology. Cell physiology 293 (1), C218-27. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00055.2007.

- Biolo, Gianni/Cederholm, Tommy/Muscaritoli, Maurizio (2014). Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: from sarcopenic obesity to cachexia. Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland) 33 (5), 737–748. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.03.007.
- Boateng, Samuel Y./Senyo, Samuel E./Qi, Lixin/Goldspink, Paul H./Russell, Brenda (2009). Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. Journal of molecular and cellular cardiology 47 (4), 426–435. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.04.006.
- Bradford, Marion M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (1-2), 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bugger, Heiko/Abel, E. Dale (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. Diabetologia 57 (4), 660–671. https://doi.org/10.1007/s00125-014-3171-6.
- Buysschaert, Martin/Bergman, Michael (2011). Definition of prediabetes. The Medical clinics of North America 95 (2), 289-97, vii. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2010.11.002.
- Carling, David (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. Trends in Biochemical Sciences 29 (1), 18–24. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.005.
- Carvalho, A. J./McKee, N. H./Green, H. J. (1997). Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. Plastic and Reconstructive Surgery 99 (1), 163–171. https://doi.org/10.1097/00006534-199701000-00025.
- Cazorla, O./Vassort, G./Garnier, D./Le Guennec, J. Y. (1999). Length modulation of active force in rat cardiac myocytes: is titin the sensor? Journal of molecular and cellular cardiology 31 (6), 1215–1227. https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.0954.
- Delp, M. D./Duan, C. (1996). Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985) 80 (1), 261–270.
 https://doi.org/10.1152/jappl.1996.80.1.261.

- Donlin, Laura T./Andresen, Christian/Just, Steffen/Rudensky, Eugene/Pappas, Christopher T./Kruger, Martina/Jacobs, Erica Y./Unger, Andreas/Zieseniss, Anke/Dobenecker, Marc-Werner/Voelkel, Tobias/Chait, Brian T./Gregorio, Carol C./Rottbauer, Wolfgang/Tarakhovsky, Alexander/Linke, Wolfgang A. (2012).
 Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. Genes & development 26 (2), 114–119. https://doi.org/10.1101/gad.177758.111.
- Drexler, H./Riede, U./Münzel, T./König, H./Funke, E./Just, H. (1992). Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. Circulation 85 (5), 1751–1759. https://doi.org/10.1161/01.CIR.85.5.1751.
- Edwards, Catherine M./Cusi, Kenneth (2016). Prediabetes: A Worldwide Epidemic. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 45 (4), 751–764. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.007.
- Foulis, A. K./Liddle, C. N./Farquharson, M. A./Richmond, J. A./Weir, R. S. (1986). The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. Diabetologia 29 (5), 267–274. https://doi.org/10.1007/bf00452061.
- Frangogiannis, Nikolaos G. (2015). Pathophysiology of Myocardial Infarction. Comprehensive Physiology 5 (4), 1841–1875. https://doi.org/10.1002/cphy.c150006.
- Fry, A. C./Allemeier, C. A./Staron, R. S. (1994). Correlation between percentage fiber type area and myosin heavy chain content in human skeletal muscle. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology 68 (3), 246–251. https://doi.org/10.1007/BF00376773.
- Funk, Florian/Kronenbitter, Annette/Isić, Malgorzata/Flocke, Vera/Gorreßen,
 Simone/Semmler, Dominik/Brinkmann, Maximilian/Beck, Katharina/Steinhoff,
 Oliver/Srivastava, Tanu/Barbosa, David Monteiro/Voigt, Katharina/Wang,
 Luzhou/Bottermann, Katharina/Kötter, Sebastian/Grandoch, Maria/Flögel,
 Ulrich/Krüger, Martina/Schmitt, Joachim P. (2022). Diabetes disturbs functional
 adaptation of the remote myocardium after ischemia/reperfusion. Journal of
 molecular and cellular cardiology 173, 47–60.
 https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.09.002.

- Furukawa, Shigetada/Fujita, Takuya/Shimabukuro, Michio/Iwaki, Masanori/Yamada, Yukio/Nakajima, Yoshimitsu/Nakayama, Osamu/Makishima, Makoto/Matsuda, Morihiro/Shimomura, Iichiro (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. The Journal of clinical investigation 114 (12), 1752–1761. https://doi.org/10.1172/JCI21625.
- Garcia, Daniel/Shaw, Reuben J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. Molecular Cell 66 (6), 789–800. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032.
- Gillani, Syed/Cao, Jue/Suzuki, Takashi/Hak, David J. (2012). The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. Injury 43 (6), 670–675. https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.008.
- Glickman, Michael H./Ciechanover, Aaron (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiological Reviews 82 (2), 373–428. https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001.
- Gomes-Marcondes, Maria Cristina C./Tisdale, Michael J. (2002). Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. Cancer Letters 180 (1), 69–74. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00006-X.
- Granzier, Henk/Labeit, Siegfried (2002). Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. The Journal of physiology 541 (Pt 2), 335–342. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.014381.
- Grundy, Scott M. (2012). Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. Journal of the American College of Cardiology 59 (7), 635–643. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.08.080.
- Hämäläinen, N./Pette, D. (1995). Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. Microscopy Research and Technique 30 (5), 381–389. https://doi.org/10.1002/jemt.1070300505.
- Hamdani, Nazha/Bishu, Kalkidan G./Frieling-Salewsky, Marion von/Redfield,
 Margaret M./Linke, Wolfgang A. (2013). Deranged myofilament phosphorylation
 and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction.
 Cardiovascular Research 97 (3), 464–471. https://doi.org/10.1093/cvr/cvs353.

- He, J./Watkins, S./Kelley, D. E. (2001). Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. Diabetes 50 (4), 817–823. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.4.817.
- Hein, S./Scholz, D./Fujitani, N./Rennollet, H./Brand, T./Friedl, A./Schaper, J. (1994).
 Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium.
 Journal of Molecular and Cellular Cardiology 26 (10), 1291–1306.
 https://doi.org/10.1006/jmcc.1994.1148.
- Hicke, Linda (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. Trends in cell biology 9 (3), 107–112. https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01491-3.
- Hidalgo, Carlos G./Chung, Charles S./Saripalli, Chandra/Methawasin, Mei/Hutchinson, Kirk R./Tsaprailis, George/Labeit, Siegfried/Mattiazzi, Alicia/Granzier, Henk L. (2013). The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKIIδ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. Journal of molecular and cellular cardiology 54, 90–97. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.012.
- Hidalgo, Carlos/Granzier, Henk (2013). Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. Trends in cardiovascular medicine 23 (5), 165–171. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.10.005.
- Hidalgo, Carlos/Hudson, Bryan/Bogomolovas, Julius/Zhu, Yi/Anderson, Brian/Greaser, Marion/Labeit, Siegfried/Granzier, Henk (2009). PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. Circulation research 105 (7), 631-8, 17 p following 638. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198465.
- Hopf, Anna-Eliane/Andresen, Christian/Kötter, Sebastian/Isić, Małgorzata/Ulrich, Kamila/Sahin, Senem/Bongardt, Sabine/Röll, Wilhelm/Drove, Felicitas/Scheerer, Nina/Vandekerckhove, Leni/Keulenaer, Gilles W. de/Hamdani, Nazha/Linke, Wolfgang A./Krüger, Martina (2018). Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. Circulation research 123 (3), 342–355. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312166.
- Horowits, R./Kempner, E. S./Bisher, M. E./Podolsky, R. J. (1986). A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. Nature 323 (6084), 160–164. https://doi.org/10.1038/323160a0.

- Hu, Junping/Klein, Janet D./Du, Jie/Wang, Xiaonan H. (2008). Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency. Endocrinology 149 (11), 5384–5390. https://doi.org/10.1210/en.2008-0132.
- Huang, Yuli/Cai, Xiaoyan/Mai, Weiyi/Li, Meijun/Hu, Yunzhao (2016). Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. BMJ (Clinical research ed.) 355, i5953. https://doi.org/10.1136/bmj.i5953.
- HUXLEY, H./HANSON, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature 173 (4412), 973– 976. https://doi.org/10.1038/173973a0.
- Jackman, Robert W./Kandarian, Susan C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. American journal of physiology. Cell physiology 287 (4), C834-43. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003.
- Jaffe, Allan S. (2013). Third universal definition of myocardial infarction. Clinical Biochemistry 46 (1-2), 1–4. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.036.
- Joumaa, V./Rassier, D. E./Leonard, T. R./Herzog, W. (2008). The origin of passive force enhancement in skeletal muscle. American journal of physiology. Cell physiology 294 (1), C74-8. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00218.2007.
- Kannel, William B./Hjortland, Marthana/Castelli, William P. (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. The American Journal of Cardiology 34 (1), 29–34. https://doi.org/10.1016/0002-9149(74)90089-7.
- Kjøbsted, Rasmus/Hingst, Janne R./Fentz, Joachim/Foretz, Marc/Sanz, Maria-Nieves/Pehmøller, Christian/Shum, Michael/Marette, André/Mounier, Remi/Treebak, Jonas T./Wojtaszewski, Jørgen F. P./Viollet, Benoit/Lantier, Louise (2018). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. The FASEB Journal 32 (4), 1741–1777. https://doi.org/10.1096/fj.201700442R.
- Knöll, Ralph/Hoshijima, Masahiko/Hoffman, Hal M./Person, Veronika/Lorenzen-Schmidt, Ilka/Bang, Marie-Louise/Hayashi, Takeharu/Shiga,
 Nobuyuki/Yasukawa, Hideo/Schaper, Wolfgang/McKenna, William/Yokoyama,
 Mitsuhiro/Schork, Nicholas J./Omens, Jeffrey H./McCulloch, Andrew D./Kimura,
 Akinori/Gregorio, Carol C./Poller, Wolfgang/Schaper, Jutta/Schultheiss, Heinz
 P./Chien, Kenneth 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 (7), 943–955. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01226-6.

- Koscak MARUYAMA (1976). Connectin, an Elastic Protein from Myofibrils. The Journal of Biochemistry 80 (2), 405–407. Online verfügbar unter https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/80/2/80_2_405/_article/char/ja/.
- Koser, Franziska/Loescher, Christine/Linke, Wolfgang A. (2019). Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? The FEBS journal 286 (12), 2240–2260. https://doi.org/10.1111/febs.14854.
- Kötter, Sebastian/Gout, Laurence/Frieling-Salewsky, Marion von/Müller, Anna Eliane/Helling, Stefan/Marcus, Katrin/Dos Remedios, Cristobal/Linke, Wolfgang A./Krüger, Martina (2013). Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. Cardiovascular Research 99 (4), 648–656. https://doi.org/10.1093/cvr/cvt144.
- Kötter, Sebastian/Kazmierowska, Malgorzata/Andresen, Christian/Bottermann,
 Katharina/Grandoch, Maria/Gorressen, Simone/Heinen, Andre/Moll, Jens
 M./Scheller, Jürgen/Gödecke, Axel/Fischer, Jens W./Schmitt, Joachim P./Krüger,
 Martina (2016). Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early
 Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. Circulation
 research 119 (9), 1017–1029. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309685.
- Kötter, Sebastian/Unger, Andreas/Hamdani, Nazha/Lang, Patrick/Vorgerd, Matthias/Nagel-Steger, Luitgard/Linke, Wolfgang A. (2014). Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. The Journal of cell biology 204 (2), 187–202. https://doi.org/10.1083/jcb.201306077.
- Krüger, Martina/Kötter, Sebastian (2016). Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. Frontiers in physiology 7, 76. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00076.
- Krüger, Martina/Kötter, Sebastian/Grützner, Anika/Lang, Patrick/Andresen,Christian/Redfield, Margaret M./Butt, Elke/dos Remedios, Cris G./Linke,Wolfgang A. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive

stiffness by phosphorylation of the titin springs. Circulation research 104 (1), 87–94. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184408.

- Labeit, Siegfried/Lahmers, Sunshine/Burkart, Christoph/Fong, Chi/McNabb,
 Mark/Witt, Stephanie/Witt, Christian/Labeit, Dietmar/Granzier, Henk (2006).
 Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. Journal of molecular biology 362 (4), 664–681. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.077.
- Leite, Felipe S./Minozzo, Fábio C./Kalganov, Albert/Cornachione, Anabelle S./Cheng, Yu-Shu/Leu, Nicolae A./Han, Xuemei/Saripalli, Chandra/Yates, John R./Granzier, Henk/Kashina, Anna S./Rassier, Dilson E. (2016). Reduced passive force in skeletal muscles lacking protein arginylation. American journal of physiology. Cell physiology 310 (2), C127-35. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00269.2015.
- Li, Y. P./Reid, M. B. (2000). NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNFalpha in differentiated skeletal muscle myotubes. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology 279 (4), R1165-70. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.4.R1165.
- Linke, W. A./Ivemeyer, M./Olivieri, N./Kolmerer, B./Rüegg, J. C./Labeit, S. (1996). Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. Journal of molecular biology 261 (1), 62–71. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0441.
- Linke, Wolfgang A./Hamdani, Nazha (2014). Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. Circulation research 114 (6), 1052–1068. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301286.
- Linke, Wolfgang A./Krüger, Martina (2010). The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. Physiology (Bethesda, Md.) 25 (3), 186–198. https://doi.org/10.1152/physiol.00005.2010.
- Lüllmann-Rauch, Renate/Asan, Esther (2019). Taschenlehrbuch Histologie. 6. Aufl. Stuttgart, Georg Thieme.
- Lun, Alexander Shiang/Chen, Ju/Lange, Stephan (2014). Probing muscle ankyrin-repeat protein (MARP) structure and function. The Anatomical Record 297 (9), 1615– 1629. https://doi.org/10.1002/ar.22968.

- Marwick, Thomas H./Ritchie, Rebecca/Shaw, Jonathan E./Kaye, David (2018).
 Implications of Underlying Mechanisms for the Recognition and Management of
 Diabetic Cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology 71 (3),
 339–351. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.019.
- Miller, Melanie K./Bang, Marie-Louise/Witt, Christian C./Labeit, Dietmar/Trombitas, Charles/Watanabe, Kaori/Granzier, Henk/McElhinny, Abigail S./Gregorio, Carol C./Labeit, Siegfried (2003). The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. Journal of molecular biology 333 (5), 951–964. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.012.
- Mohamed, Belal A./Schnelle, Moritz/Khadjeh, Sara/Lbik, Dawid/Herwig, Melissa/Linke, Wolfgang A./Hasenfuss, Gerd/Toischer, Karl (2016). Molecular and structural transition mechanisms in long-term volume overload. European Journal of Heart Failure 18 (4), 362–371. https://doi.org/10.1002/ejhf.465.
- Moncman, C. L./Wang, K. (1995). Nebulette: a 107 kD nebulin-like protein in cardiac muscle. Cell motility and the cytoskeleton 32 (3), 205–225. https://doi.org/10.1002/cm.970320305.
- Müller, Anna E./Kreiner, Matthias/Kötter, Sebastian/Lassak, Philipp/Bloch, Wilhelm/Suhr, Frank/Krüger, Martina (2014). Acute exercise modifies titin phosphorylation and increases cardiac myofilament stiffness. Frontiers in Physiology 5, 449. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00449.
- Munkanatta Godage, Dhanushka N. P./VanHecke, Garrett C./Samarasinghe, Kusal T.
 G./Feng, Han-Zhong/Hiske, Mark/Holcomb, Joshua/Yang, Zhe/Jin, JianPing/Chung, Charles S./Ahn, Young-Hoon (2018). SMYD2 glutathionylation
 contributes to degradation of sarcomeric proteins. Nature Communications 9 (1),
 4341. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06786-x.
- Muñoz-Cánoves, Pura/Scheele, Camilla/Pedersen, Bente K./Serrano, Antonio L. (2013). Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? The FEBS journal 280 (17), 4131–4148. https://doi.org/10.1111/febs.12338.
- Nathan, David M./Davidson, Mayer B./DeFronzo, Ralph A./Heine, Robert J./Henry, Robert R./Pratley, Richard/Zinman, Bernard (2007). Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance: Implications for care. Diabetes care 30 (3), 753– 759. https://doi.org/10.2337/dc07-9920.

- Oberbach, Andreas/Bossenz, Yvonne/Lehmann, Stefanie/Niebauer, Josef/Adams, Volker/Paschke, Ralf/Schön, Michael R./Blüher, Matthias/Punkt, Karla (2006). Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes care 29 (4), 895–900. https://doi.org/10.2337/diacare.29.04.06.dc05-1854.
- Ooi, Daylily S./Isotalo, Phillip A./Veinot, John P. (2000). Correlation of Antemortem Serum Creatine Kinase, Creatine Kinase-MB, Troponin I, and Troponin T with Cardiac Pathology. Clinical Chemistry 46 (3), 338–344. https://doi.org/10.1093/clinchem/46.3.338.
- Ottenheijm, Coen A. C./van Hees, Hieronymus W. H./Heunks, Leo M. A./Granzier, Henk (2011). Titin-based mechanosensing and signaling: role in diaphragm atrophy during unloading? American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 300 (2), L161-6. https://doi.org/10.1152/ajplung.00288.2010.
- Panchal, Sunil K./Poudyal, Hemant/Iyer, Abishek/Nazer, Reeza/Alam, Ashraful/Diwan, Vishal/Kauter, Kathleen/Sernia, Conrad/Campbell, Fiona/Ward, Leigh/Gobe, Glenda/Fenning, Andrew/Brown, Lindsay (2011). High-carbohydrate high-fat diet–induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. Journal of cardiovascular pharmacology 57 (1), 51–64. https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181feb90a.
- Pape, Hans-Christian/Kurtz, Armin/Silbernagl, Stefan (2018). Physiologie. Georg Thieme Verlag.
- Park, Seok Won/Goodpaster, Bret H./Strotmeyer, Elsa S./Kuller, Lewis H./Broudeau, Robert/Kammerer, Candace/Rekeneire, Nathalie de/Harris, Tamara B./Schwartz, Ann V./Tylavsky, Frances A./Cho, Yong-wook/Newman, Anne 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 (6), 1507–1512. https://doi.org/10.2337/dc06-2537.
- Penning, L. (2000). Psoas muscle and lumbar spine stability: a concept uniting existing controversies. Critical review and hypothesis. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society 9 (6), 577–585. https://doi.org/10.1007/s005860000184.

- Perry, Ben D./Caldow, Marissa K./Brennan-Speranza, Tara C./Sbaraglia, Melissa/Jerums, George/Garnham, Andrew/Wong, Chiew/Levinger, Pazit/Asrar ul Haq, Muhammad/Hare, David L./Price, S. Russ/Levinger, Itamar (2016). Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise. Exercise immunology review 22, 94– 109.
- Pette, Dirk/Staron, Robert S. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. In: Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 116. Springer, Berlin, Heidelberg, 1–76.
- Pette, Dirk/Staron, Robert S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microscopy Research and Technique 50 (6), 500–509. https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7.
- Prado, Lucas G./Makarenko, Irina/Andresen, Christian/Krüger, Martina/Opitz, Christiane A./Linke, Wolfgang A. (2005). Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. The Journal of general physiology 126 (5), 461–480. https://doi.org/10.1085/jgp.200509364.
- Protasi, Feliciano/Takekura, Hiroaki/Wang, Yaming/Chen, S. WayneR./Meissner, Gerhard/Allen, Paul D./Franzini-Armstrong, Clara (2000). RYR1 and RYR3 Have Different Roles in the Assembly of Calcium Release Units of Skeletal Muscle. Biophysical journal 79 (5), 2494–2508. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76491-5.
- Rácz, I. B./Sarkadi, L./Hamar, J. (1996). The functional damages of ischemic/reperfused skeletal muscle. Acta physiologica Hungarica 84 (3), 205– 216.
- Raskin, Anna/Lange, Stephan/Banares, Katherine/Lyon, Robert C./Zieseniss, Anke/Lee, Leonard K./Yamazaki, Katrina G./Granzier, Henk L./Gregorio, Carol
 C./McCulloch, Andrew D./Omens, Jeffrey H./Sheikh, Farah (2012). A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. Journal of Biological Chemistry 287 (35), 29273–29284. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.372839.

- Rehman, Kanwal/Akash, Muhammad Sajid Hamid (2017). Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? Journal of Cellular Biochemistry 118 (11), 3577–3585. https://doi.org/10.1002/jcb.26097.
- Ritov, Vladimir B./Menshikova, Elizabeth V./He, Jing/Ferrell, Robert E./Goodpaster, Bret H./Kelley, David E. (2005). Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. Diabetes 54 (1), 8–14. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.8.
- Schiaffino, S./Reggiani, C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985) 77 (2), 493–501. https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493.
- Scott, Wayne/Stevens, Jennifer/Binder–Macleod, Stuart A. (2001). Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. Physical Therapy 81 (11), 1810–1816. https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810.
- Shibata, Rei/Sato, Kaori/Pimentel, David R./Takemura, Yukihiro/Kihara, Shinji/Ohashi, Koji/Funahashi, Tohru/Ouchi, Noriyuki/Walsh, Kenneth (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. Nature Medicine 11 (10), 1096–1103. https://doi.org/10.1038/nm1295.

Silverthorn, Dee Unglaub (2009). Physiologie. Pearson Deutschland GmbH.

- Solomon, V./Baracos, V./Sarraf, P./Goldberg, A. L. (1998). Rates of ubiquitin conjugation increase when muscles atrophy, largely through activation of the Nend rule pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (21), 12602–12607. https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12602.
- Sorimachi, Hiroyuki/Ono, Yasuko/Suzuki, Koichi (2000). Skeletal Muscle-Specific Calpain, p94, and Connectin/Titin: Their Physiological Functions and Relationship to Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. In: Elastic Filaments of the Cell. Springer, Boston, MA, 383–404.
- Steinberg, Gregory R./Smith, Angela C./van Denderen, Bryce J. W./Chen, Zhiping/Murthy, Sid/Campbell, Duncan J./Heigenhauser, G. J. F./Dyck, David J./Kemp, Bruce E. (2004). AMP-activated protein kinase is not down-regulated in

human skeletal muscle of obese females. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 89 (9), 4575–4580. https://doi.org/10.1210/jc.2004-0308.

- Surwit, R. S./Feinglos, M. N./Rodin, J./Sutherland, A./Petro, A. E./Opara, E. C./Kuhn, C. M./Rebuffe-Scrive, M. (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and mice. Metabolism 44 (5), 645–651. https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90123-X.
- Swist, Sandra/Unger, Andreas/Li, Yong/Vöge, Anja/Frieling-Salewsky, Marion von/Skärlén, Åsa/Cacciani, Nicola/Braun, Thomas/Larsson, Lars/Linke, Wolfgang A. (2020). Maintenance of sarcomeric integrity in adult muscle cells crucially depends on Z-disc anchored titin. Nature Communications 11 (1), 4479. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18131-2.
- Thrainsdottir, Inga S./Aspelund, Thor/Thorgeirsson, Gudmundur/Gudnason, Vilmundur/Hardarson, Thordur/Malmberg, Klas/Sigurdsson, Gunnar/Rydén, Lars (2005). The association between glucose abnormalities and heart failure in the population-based Reykjavik study. Diabetes care 28 (3), 612–616. https://doi.org/10.2337/diacare.28.3.612.
- Tomas, F. M./Munro, H. N./Young, V. R. (1979). Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N tau-methylhistidine. Biochemical Journal 178 (1), 139–146. https://doi.org/10.1042/bj1780139.
- Trombitás, K./Greaser, M./French, G./Granzier, H. (1998). PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10. Journal of Structural Biology 122 (1-2), 188–196. https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3984.
- Trombitás, K./Redkar, A./Centner, T./Wu, Y./Labeit, S./Granzier, H. (2000). Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity. Biophysical journal 79 (6), 3226–3234. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76555-6.
- Vibert, Peter/Craig, Roger/Lehman, William (1997). Steric-model for activation of muscle thin filaments 1 1 Edited by P.E. Wright. Journal of molecular biology 266 (1), 8–14. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0800.
- Vlahovic, Hrvoje/Bazdaric, Ksenija/Marijancic, Verner/Soic-Vranic, Tamara/Malnar, Daniela/Arbanas, Juraj (2017). Segmental fibre type composition of the rat

iliopsoas muscle. Journal of Anatomy 230 (4), 542–548. https://doi.org/10.1111/joa.12588.

- Walker, P. M. (1991). Ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. Annals of vascular surgery 5 (4), 399–402. https://doi.org/10.1007/BF02015307.
- Warram, J. H./Martin, B. C./Krolewski, A. S./Soeldner, J. S./Kahn, C. R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. Annals of internal medicine 113 (12), 909–915. https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-12-909.
- Weyer, C./Bogardus, C./Mott, D. M./Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. The Journal of clinical investigation 104 (6), 787–794. https://doi.org/10.1172/JCI7231.
- Williams, J. H./Ward, C. W. (1998). Changes in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum function and force production following myocardial infarction in rats.
 Experimental Physiology 83 (1), 85–94.
 https://doi.org/10.1113/expphysiol.1998.sp004094.
- Winzell, Maria Sörhede/Ahrén, Bo (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. Diabetes 53 Suppl 3, S215-9.
 https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s215.
- Witt, Christian C./Burkart, Christoph/Labeit, Dietmar/McNabb, Mark/Wu, Yiming/Granzier, Henk/Labeit, Siegfried (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. The EMBO Journal 25 (16), 3843–3855. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601242.
- Yokota, Takashi/Kinugawa, Shintaro/Hirabayashi, Kagami/Matsushima, Shouji/Inoue, Naoki/Ohta, Yukihiro/Hamaguchi, Sanae/Sobirin, Mochamad A./Ono, Taisuke/Suga, Tadashi/Kuroda, Satoshi/Tanaka, Shinya/Terasaki, Fumio/Okita, Koichi/Tsutsui, Hiroyuki (2009). Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 297 (3), H1069-77. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00267.2009.

Zheng, Yan/Ley, Sylvia H./Hu, Frank B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nature reviews. Endocrinology 14 (2), 88–98. https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger bedanken. Danke für die Möglichkeit, an so einem großartigen Projekt zu arbeiten. Danke für die hervorragende Betreuung, die wegweisenden Anregungen und die mühevolle Korrektur. Danke für den ermutigenden Zuspruch vor meiner ersten Posterpräsentation auf dem deutschen Physiologenkongress. Und danke für die tolle Atmosphäre im Team, die dazu beigetragen hat, dass ich mich während meiner Zeit im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie sehr wohl gefühlt habe.

Zudem möchte ich meiner Co-Betreuerin Frau Prof. Dr. Maria Grandoch für die Bereitstellung meiner Proben und die Betreuung während der Anfertigung der Dissertation danken.

Ein großes Dankeschön geht an die AG Krüger mit Sabine Bongardt und Dr. Sebastian Kötter. Ihr habt mich toll in das Team integriert und mir wesentliche Hürden für die erste Datenerhebung genommen. Ein herzliches Danke geht an Dr. David Barbosa, der in den Anfängen meiner Dissertation die Betreuung übernommen hat und mir stets als Ratgeber und Helfer beiseite stand. Ferner möchte ich dem Sonderforschungsbereich 1116 und der Deutschen Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung während der Anfertigung meiner Dissertation danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mir sehr viel Rückhalt geben und mich auf meinem Weg unterstützen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin Jenny bedanken für die Motivation, die bedingungslose Unterstützung und den notwendigen Ausgleich an den freien Tagen.