

Aus dem Institut für Herz-und Kreislaufphysiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Martina Krüger

Einfluss einer Diät assoziierten intramuskulären Lipid Akkumulation auf die Skelettmuskelfunktion bei Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus im Mausmodell

Dissertation

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

vorgelegt von
Julian Niklas Große

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachertin: Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers

Zusammenfassung

Diabetes mellitus und Adipositas sind mit einer Akkumulation von intramuskulären Lipiden in Form von *Lipid Droplets* (LD) assoziiert. Vor dem Hintergrund einer hohen Prävalenz und einer zunehmenden Inzidenz der Erkrankungen in der westlichen Bevölkerung, beschäftigt sich diese Arbeit mit den Auswirkungen akkumulierender LD auf die Muskelfunktion in der diabetischen Skelettmuskulatur. LD sind auch in gesunder Muskulatur zu finden und übernehmen bei körperlicher Aktivität eine wichtige Funktion in der Substratversorgung der arbeitenden Muskulatur. Sie bestehen aus einem Lipidkern und einem umgebenden *Monolayer* aus Phospholipiden, in den unter anderem Perilipine (PLIN) eingelagert sind. In dieser Arbeit stehen die Perilipine 2 und 5 im Fokus, die an der Regulation des muskulären Energiestoffwechsels beteiligt sind. Zusätzlich wird die Auswirkungen der Diabetes mellitus Erkrankung auf das Protein Titin untersucht. Titin ist das größte Protein des menschlichen Körpers und wird neben Aktin und Myosin auch als drittes Myofilament bezeichnet. Es spannt sich im Sarkomer zwischen Z-Streifen und dem Myosinfilament auf und hält aufgrund seiner elastischen Eigenschaften und passiven Spannung bei Dehnung die Filamente Aktin und Myosin in Position zueinander. Die Steife des Titins kann über posttranslationale Veränderungen moduliert werden, was im Zuge dieser Arbeit untersucht wird. Zur Analyse der Effekte der LD-Akkumulation auf Muskelkraft und Ermüdung wurde ein Mausmodell sowohl für Diabetes mellitus Typ I mittels Streptozotocin (STZ)- Behandlung als auch für Diabetes mellitus Typ II mittels STZ in Kombination mit *High fat/ high sucrose* (DIOSTZ) Futter erzeugt. Als Referenzgruppe dienten Kontrollmäuse ohne STZ- Behandlung bei Fütterung mit Standardfutter. Die in vitro Muskelkraftmessung wurde am präparierten M. soleus durchgeführt, wobei die maximale isometrische tetanische Kraft (PO) sowie die Ermüdung gemessen wurde. Außerdem wurde mittels SDS-Page und Western Blot Proteinanalysen durchgeführt. Dabei wurde eine Analyse des Phosphorylierungslevels am Titin für die Position Serin 11878 und an der Proteinkinase C α (PKC α) für die Position Threonin 497 durchgeführt. Ergänzend wurde biochemisch sowie immunhistochemisch die relative Menge von PLIN 2 und 5 in den jeweiligen Versuchsgruppen bestimmt. Zur Korrelation mit der Ermüdungsmessung wurden außerdem immunhistochemisch an Muskelquerschnitten die Muskelfasertypen- Verteilung analysiert. Als Arbeitshypothese wurde eine Beeinträchtigung der Muskelkraft durch die akkumulierten LD angenommen und tatsächlich konnte in der DIOSTZ-Versuchsgruppe eine signifikante Abnahme der PO um 59,38% beobachtet werden. In Bezug zur Arbeitshypothese wurde sowohl immunhistochemisch als auch biochemisch eine deutliche Zunahme der PLIN 2 ($+27,9 \pm 6,1\%$) und 5 ($97,2\% \pm 9,5\%$) als Surrogat Marker für LD in den DIOSTZ behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Im Vergleich der STZ-Tiere mit der Kontrolle ergaben sich für PLIN2 zwar keine signifikanten Unterschiede, aber für PLIN5 eine Zunahme ($35,5\% \pm 8,2\%$). Dies gilt zum einen als *Proof of Concept* für die Erzeugung von LD in vivo aber zum anderen bestätigen die Ergebnisse der PLIN-Analyse die Arbeitshypothese, sodass eine Akkumulation der LD die Muskelkraft beeinflussen kann. In der Ermüdungsmessung zeigten sich überraschenderweise in den diabetischen Versuchsgruppen eine langsamere Ermüdung Vergleich zur Kontrolle, was mit einer erhöhten PLIN5 Konzentration korreliert. In den diabetischen Mausgruppen kam es zu einer Abnahme der Typ IIB Muskelfasern und zusätzlich in der DIOSTZ Gruppe zu einer Abnahme der Typ I und korrelierenden Zunahme der Typ IIA Muskelfasern. Dies kann die langsamere Ermüdung nicht erklären, sodass die verstärkte Metabolisierung der LD als Erklärung herangezogen wird. Für die Analyse des Titins ergab sich eine Hypophosphorylierung im diabetischen M. soleus, trotz erhöhter PKC α - Aktivität, was ebenso die reduzierte Muskelkraft erklären kann. Die Ergebnisse beweisen eindeutig die Beeinträchtigung der Muskelfunktion im Diabetes mellitus Typ II Modell, jedoch ergibt sich Forschungsbedarf zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen.

Abstract

Diabetes mellitus and obesity are associated with an accumulation of intramuscular lipids in the form of lipid droplets (LD). Given the high prevalence and increasing incidence of these conditions in the Western population, this study focuses on the effects of accumulating LD on muscle function in diabetic skeletal muscle. LD are also found in healthy muscle and play an important role in substrate supply to working muscles during physical activity. They consist of a lipid core surrounded by a phospholipid monolayer in which perilipins (PLIN) are embedded. This study focuses on perilipins 2 and 5, which are involved in the regulation of muscular energy metabolism. Additionally, the effects of diabetes mellitus on the muscle protein titin are examined. Titin is the largest protein in the human body and, along with actin and myosin, is also referred to as the third myofilament. It spans the sarcomere between Z-discs and the myosin filament, maintaining the filaments of actin and myosin in position relative to each other due to its elastic properties and passive tension during stretching. The stiffness of titin can be modulated by post-translational modifications, which are examined in this study. To analyze the effects of LD accumulation on muscle strength and fatigue, a mouse model was generated for both type I diabetes mellitus using streptozotocin (STZ) treatment and type II diabetes mellitus using STZ in combination with high fat/high sucrose (DIOSTZ) diet. Control mice without STZ treatment fed with standard diet served as the reference group. In vitro muscle strength measurement was performed on the prepared M. soleus, measuring maximum isometric tetanic force (PO) and fatigue. Additionally, protein analyses were performed using SDS-PAGE and Western blotting, including an analysis of phosphorylation levels on titin at position serine 11878 and on protein kinase C α (PKC α) at position threonine 497. Furthermore, the relative amount of PLIN 2 and 5 in the respective experimental groups was determined biochemically and immunohistochemically. Immunohistochemical analysis of muscle cross-sections was also conducted to correlate with fatigue measurement by analyzing muscle fiber type distribution.

As a working hypothesis, a decrease in muscle strength due to accumulated LD was assumed, and indeed, a significant decrease in PO of 59.38% was observed in the DIOSTZ experimental group. Consistent with the working hypothesis, a significant increase in PLIN 2 ($+27.9\% \pm 6.1\%$) and 5 ($97.2\% \pm 9.5\%$) as surrogate markers for LD was found both immunohistochemically and biochemically in DIOSTZ-treated mice compared to the control group. While there were no significant differences for PLIN2 between STZ-treated mice and the control, an increase was observed for PLIN5 ($35.5\% \pm 8.2\%$). This serves as proof of concept for the generation of LD in vivo, and the results of the PLIN analysis confirm the working hypothesis, indicating that accumulation of LD influence muscle strength. Surprisingly, fatigue measurement showed slower fatigue in the diabetic experimental groups compared to the control, which correlated with an increased PLIN5 concentration. In terms of muscle fiber composition, there was a decrease in type IIB muscle fibers in the diabetic mouse groups, and additionally, in the DIOSTZ group, there was a decrease in type I fibers and a corresponding increase in type IIA muscle fibers. This cannot explain the slower fatigue, so increased LD metabolism is used as an explanation. Analysis of titin revealed hypophosphorylation in diabetic M. soleus, despite increased PKC α activity, which could also explain the reduced muscle strength. The results clearly demonstrate impairment of muscle function in the type II diabetes mellitus model, but further research is needed to elucidate the pathophysiological mechanisms.

Abkürzungsverzeichnis

A-Bande	-Anisotrop lichtbrechende Bande
Abb.	-Abbildung
APS	-Ammoniumpersulfat
Anova	- <i>Analysis of Variance</i>
ADP	-Adenosindiphosphat
ATP	- Adenosintriphosphat
ATPase	- Adenosintriphosphatase
Bis	-Methylenbisacrylamid
BSA	- Bovines Serumalbumin
C	- Kontrolltiere
Ca ²⁺	- Kalziumionen
CE	-Cholesterin(ester)
CGI-58	- <i>comparative gene identification-58</i>
CSA	- Cross Sectional Area
°C	- Grad Celsius -°
DAG	-Diacylglycerol
dl	-Deziliter
DTT	- Dithiothreitol
DIOSTZ Tiergruppe	- Versuchstiere mit <i>High Fat/High Sucrose</i> Futter + STZ-Injektionen
DS	-DIOSTZ Tiere
EDL	- Musculus Extensor digitorum longus
F-Fasern	- schneller Muskelfasertyp
FL	- optimale Faserlänge
G	-Gramm
Glut 4	-Glukosetransporter 4
O ₂	- Sauerstoff
HbA1C	- glykiertes Hämoglobin A
HZ	-Hertz
I-Bande	- Isotrop lichtbrechende Bande
ICH	-Immunhistochemie
Ig Domäne	-Immunglobulin ähnliche Domäne des Titins
kDA	-kilo Dalton
kg	- Kilogramm
LDA	- <i>Length dependent activation</i>
LD	- <i>Lipid Droplet</i>
LO	-optimale Länge des Muskelpräparates (am Myograph eingestellt)
M	- Mol
mA	- Milliampere
mg	- Milligramm
ml	- Milliliter
mM	-Millimolar
n	- Anzahl
NGS	-Normal Goat Serum
NPG	-Nüchternplasmaglukose
OCT	- Optimum Cutting Temperature compound
P=	- p- Wert
p-	- phospho, als Präfix zum Hinweis auf eine Phosphorylierung

PAGE	- Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)
PDH	-Pyruvatdehydrogenase
PK4	- Pyruvatdehydrogenasekinase 4
PFA	- Paraformaldehyd
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PEVK- Region	-Prolin, Glutamin, Valin und Lysin reiche Region im Titin
PKC α	- Proteinkinase C α
PLIN	-Perilipin
PO	- gemessene maximale isometrische tetanische Kraft des Muskelpräparates
PPAR	- <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
pS11878	-phosphoryliertes Serin an Position 11878 im humanen Titin
PVDF	-Polyvinylendifluorid
ROI	- <i>Region of Interest</i>
ROS	- <i>Reactive oxygen species</i>
S	- Serinrest
S-Fasern	- langsamer Muskelfasertyp
SEM	- <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SERCA	- Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
sPO	- errechnete spezifische Kraft des Muskelpräparates
SR	-sarkoplasmatisches Retikulum
SDS	-Natriumdodecylsulfat
SDS- PAGE	- Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)
STZ	-Streptozotocin
STZ-Tiergruppe	- Versuchstiere mit Standardfutter + STZ-Injektionen
T	- Threonin Rest
TAG	-Triacylglycerol
TBS	- <i>Tris buffered Saline</i>
TBST	- <i>Tris buffered Saline</i> + Tween
V	- Volt
VLDL Cholesterin	-Very Low-Density Lipoprotein Cholesterin
W	-Woche
μm	- Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie der quergestreiften Muskulatur	1
1.1.1 Histologischer Aufbau der Skelettmuskulatur	1
1.1.2 Zytoskelett und Strukturproteine	4
1.1.3 Sarkoplasmatisches Retikulum	4
1.2 Die Sarkomerproteine Aktin, Myosin und Titin	6
Aktin und Myosin	6
1.2.1 Titin als drittes Myofilament	7
1.2.2 Titin modulierte Steifigkeit der Skelettmuskulatur	9
1.3 Physiologie der quergestreiften Muskulatur	10
1.4 Fasertypen	12
1.5 Muskelkraft und Ermüdung	15
1.5.1 Frequenz- Kraft Zusammenhang	15
1.5.2 Auswirkung von Titin auf die aktive Muskelkraft	16
1.5.3 Ermüdung	17
1.6 Metabolismus und Energieversorgung der Skelettmuskulatur	18
1.6.1 Die Rolle der <i>Lipid Droplets</i> in der gesunden Muskulatur	18
1.6.2 Perilipin 5 – Ein Überblick	21
1.6.3 Perilipin 2 – Ein Überblick	21
1.7 Diabetes mellitus	22
1.7.1 Epidemiologie	22
1.7.2 Pathophysiologie Diabetes Mellitus Typ I und II	23
1.8 Diabetes mellitus und die Muskelfunktion	24
1.8.1 Diabetische Myopathie	25
1.8.2 Insulinresistenz und molekularer Mechanismus der Diabetes Induzierten Veränderungen am Skelettmuskel	26
1.8.3 Die Rolle der <i>Lipid Droplets</i> in der diabetischen Muskulatur	27
1.8.4 Das verwendete Mausmodell für Diabetes mellitus	28

1.9 Ziele der Arbeit	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Versuchstiere	30
2.1.2 Chemikalien	32
2.1.3 Puffer- und Lösungen	33
2.1.4 Antikörper	34
2.1.5 Geräte, Instrumente und <i>Software</i>	38
2.2 Methoden	40
2.2.1 Präparation und Isolation der Muskulatur am Mausmodel	40
2.2.2 Aufbau und Funktionsweise des MyoDYNAMIC Muscle Strip System (Firma DMT)	43
2.2.3 Ablauf der Messung und Messprotokoll	44
2.2.4 Berechnung der spezifischen Kraft (sPo)	49
2.2.5 Kryokonservierung und histologische Aufarbeitung	50
2.2.6 Proteinbiochemie	52
2.2.7 Statistik	58
3 Ergebnisse	59
3.1 Versuchstiere	59
3.1.1 Gewicht und Blutzuckerwerte der gesamten Stichprobe	59
3.1.2 Gewicht und Blutzuckerwerte der zur Muskelmessung herangezogenen Subpopulation	61
3.1.3 Optimale Länge und Gewicht der Muskelpräparate	63
3.2 Ergebnisse der Kraftmessung	68
3.2.1 Auswertung der Kraftmessung in der Kontrollgruppen Stichprobe	68
3.2.2 Auswertung der Kraftmessung in der DIOSTZ- Stichprobe	69
3.2.3 Auswertung der Kraftmessung in der STZ- Stichprobe	70
3.2.4 Vergleich der Kontrollgruppen-, DIOSTZ- und STZ- Stichprobe	70
3.3 Ergebnisse der Ermüdungsmessung	73
3.4 Auswertung der Muskelfasertypenbestimmung	77
3.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Perilipine	79
3.5.1. Perilipin 2	79
3.5.2 Perilipin 5	82
3.6 Auswertung der biochemischen Proteinanalysen (Western Blot)	84
3.6.1 Perilipin 2 und 5	84
3.6.2 Titin und Proteinkinase C α	86
4 Diskussion	89

4.1 Eignung des Mausmodells für die Fragestellung.....	89
4.1.1. Muskel- und Körpergewicht der Versuchstiere	89
4.1.2 Blutzuckerwerte	90
4.2 Auswirkung der STZ-Behandlung und der HFD auf die Muskelkraft im Rahmen der Kraftmessung	91
4.2.1. Einfluss der STZ-Behandlung auf die Muskelkraft.....	92
4.2.2 Einfluss der lipidreichen Ernährung in Kombination mit der STZ-Behandlung auf die Muskelkraft	93
4.3 Einfluss der Titin Veränderungen auf die Muskelkraft und die optimale Muskellänge ..	95
4.3.1 Einfluss der Titin- Veränderung auf die optimale Muskellänge	96
4.3.2 Einfluss der Titin Veränderungen auf die Muskelkraft.....	97
4.4 Einfluss der HFD und des Diabetes mellitus auf die Ermüdung des Skelettmuskels.....	98
4.5 Muskelfasertypen Verteilung	99
4.5.1 Einfluss der STZ-Behandlung auf die Verteilung der Muskelfasertypen und die Ermüdungsresistenz	100
4.5.2 Einfluss der DIOSTZ-Behandlung auf die Verteilung der Muskelfasertypen und die Ermüdungsresistenz	100
4.6 Limitationen.....	102
4.7 Fazit	103
5. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	104
6. Anhang.....	116

1 Einleitung

1.1 Anatomie der quergestreiften Muskulatur

Da sich diese Forschungsarbeit in großen Teilen mit der Funktion der Skelettmuskulatur beschäftigt, ist es zum Verständnis der komplexen Funktionsweise, notwendig die Anatomie der Skelettmuskulatur als Grundlage für die Funktionsweise hier darzustellen.

Der Anteil des Muskelgewebes am Körpergewicht des Menschen beträgt ungefähr 40%, wobei bis zu 75% der Proteine des menschlichen Körpers enthalten sein können [1]. Dabei unterliegt die Muskelmasse vielen Einflüssen wie dem Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -degradation, dem Ernährungszustand, dem Hormongleichgewicht und Trainingszustand, aber auch Krankheiten oder Verletzungen [1]. Trotz dieser mannigfaltigen Einwirkungen folgt die Anatomie der Muskulatur einem komplexen Bauplan. Das Muskelgewebe ist nicht nur dafür verantwortlich chemische Energie in mechanische Energie umzusetzen und damit Körperbewegung zu ermöglichen, sondern ist vielmehr auch an der Wärmeproduktion, der Speicherung wichtiger Substrate und dem Verbrauch des Großteils von Sauerstoff und Nährstoffen während körperlicher Aktivität beteiligt [1]. Neben den zahlreichen weiteren Funktionen des Muskelgewebes spielt die Muskulatur mittels Metabolisierung von Glukose und Fettsäureoxidation auch eine Schlüsselrolle in der systemischen Energiehomöostase [2]. Zunächst wird jedoch der anatomische und histologische Aufbau der Skelettmuskulatur als Basis für das Verständnis der komplexen physiologischen Vorgänge bei der Muskelkontraktion und Kraftentwicklung dargestellt.

1.1.1 Histologischer Aufbau der Skelettmuskulatur

Die Grundbaueinheiten der Skelettmuskulatur sind die Muskelfasern, die aus vielkernigen Synzytien bestehen, bis zu 10 cm lang sein können und einen Durchmesser von bis zu 100 μm haben [3],[4]. Die Funktionseinheit der Skelettmuskulatur ist das Primärbündel (Abb.1), was von ca. 100 parallel verlaufenden Muskelfasern gebildet wird. Innerhalb des Primärbündels wird jede Muskelfaser von bindegewebigen Fasern, dem Endomysium, umgeben. Die Primärbündel werden im Ganzen von einer bindegewebigen Verschiebeschicht, dem Perimysium internum, umgeben, sodass ein Gleiten der Funktionseinheiten ermöglicht wird, was eine Längenänderung ermöglicht. Weiterhin kann man unterteilen in Sekundärbündel, die von mehreren Primärbündeln und dem umgebenden Perimysium externum gebildet werden. Die Gesamtheit aller Sekundärbündel und das umgebende Epimysium bilden schließlich den Gesamtmuskel. Der Gesamtmuskel wird von einer Faszie umgeben, die den Gesamtmuskel verschieblich gegen das umgebende Gewebe abgrenzt und mit dem Epimysium verbunden ist [3]. Da die Skelettmuskulatur, wie bereits beschrieben, chemische Energie in mechanische Energie umwandelt, ist eine Versorgung des Gewebes mit Substraten und O_2 sowie ein Abtransport von Metaboliten essenziell. Dafür gibt es innerhalb des Endomysiums ein reich entwickeltes Geflecht aus Kapillaren um die einzelnen Muskelfasern [3]. Motorische Nerven bilden an der Skelettmuskulatur eine motorische Endplatte, über die die Muskulatur willkürlich erregt werden kann. Die Axone der efferenten Neurone verzweigen sich baumartig und bilden anschließend mehrere motorische Endplatten. Die Gesamtheit aus motorischem Neuron und den innervierten Muskelfasern bezeichnet man als motorische Einheit. Abhängig von der Größe der motorischen Einheit sind grobmotorische oder aber auch feinmotorische Bewegungen möglich[5],[3].

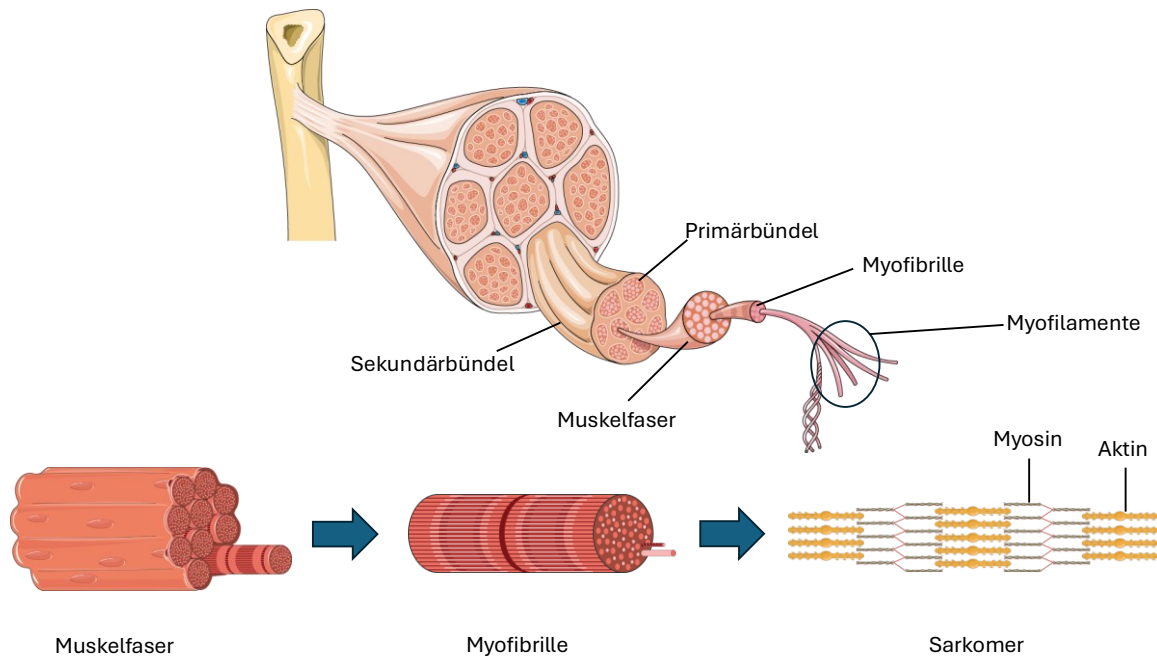


Abb. 1 Histologische Anatomie des Skelettmuskels

Dargestellt ist die Hierarchie der Skelettmuskel-Histologie, ein Sekundärbündel besteht aus mehreren Primärbündeln, die wiederum aus mehreren Muskelfasern bestehen, eine Muskelfaser besteht aus den Myofibrillen, die sich aus den Myofilamenten Myosin und Aktin zusammensetzen; die kleinste Grundbaueinheit des Skelettmuskels ist das Sarkomer, Abbildungen entnommen aus Servier Medical Art 2024 [6], Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Betrachtet man eine Skelettmuskelfaser unter dem Lichtmikroskop (Abb. 2), erkennt man die charakteristische Querstreifung sowie mehrere durch die Myofilamente Aktin und Myosin an den Rand gedrängte Zellkerne unterhalb des Sarkolemm, das die Zellmembran der Muskelfaser darstellt [5],[7]. Um zu verstehen, wie diese charakteristische Querstreifung entsteht, muss man die Ultrastruktur der Muskelfasern genauer betrachten. Bündel aus dicht gepackten Myofibrillen mit einem Durchmesser von ungefähr $1\mu\text{m}$ bilden die Muskelfasern und erstrecken sich über die gesamte Länge. Myofibrillen wiederum bestehen aus parallel angeordneten Myofilamenten, die hauptsächlich aus den für die Muskelkontraktion verantwortlichen Proteinen Aktin und Myosin bestehen [8],[7]. Dabei werden Aktinfilamente gemäß ihrem Durchmesser als dünne Filamente (6nm) und Myosinfilamente (15nm) als dicke Filamente bezeichnet [5]. Zudem sind die Aktinfilamente mit Troponin und Tropomyosin assoziiert, die ebenso zu den dünnen Filamenten gezählt werden [3]. Entlang der Myofibrillen lagern sich parallel die Mitochondrien an. Frontera und Ochala beschreiben, dass die Mitochondrien in der gesamten Muskelfaser ein dreidimensionales Netzwerk bilden und damit die Energiebereitstellung für den Querbrückenzyklus sichern [1]. Myofibrillen und Mitochondrien füllen fast das gesamte Sarkoplasma der Muskelzelle aus und drängen die Zellkerne an den Rand der Zelle. Im gesamten Sarkoplasma der Muskelzelle sind zudem Glykogen Einschlüsse und Fetttröpfchen zu finden [3]. Die lichtmikroskopisch sichtbare Querstreifung ist Ausdruck des komplexen und streng geordneten Bauplans der Muskulatur.

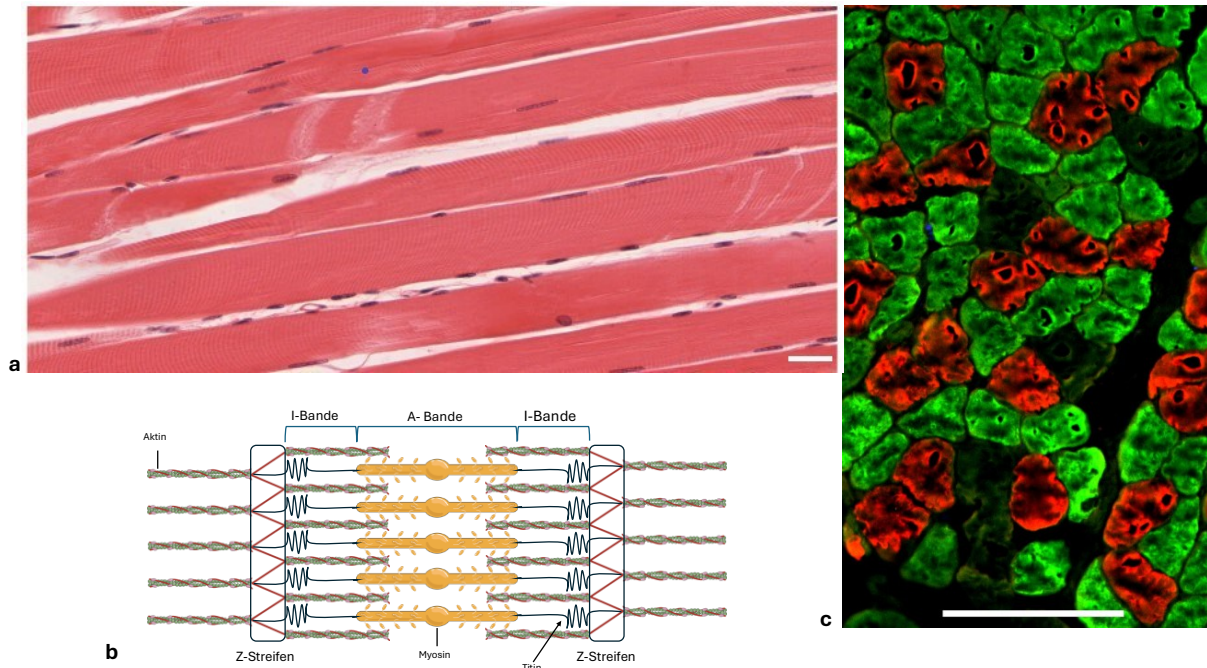


Abb. 2 Skelettmuskulatur unter dem Lichtmikroskop

- Dargestellt ist die Skelettmuskulatur unter dem Lichtmikroskop, zu erkennen ist hier die charakteristische Querstreifung der Skelettmuskulatur mit an den Rand gedrängten Zellkernen, Maßstab $\triangleq 20\mu\text{m}$; modifiziert nach OpenStax, Anatomy and Physiology <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/references>, Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>; [9]
- Schematische Darstellung der histologischen Ultrastruktur eines Sarkomers mit den Myofilamenten Aktin und Myosin sowie dem Titin als molekulare Basis der Querstreifung, Aktin ist am Z- Streifen verankert und interagiert mit den Myosinköpfchen, das Titin reicht vom Z- Streifen bis zum Myosinmolekül und stabilisiert die Sarkomer, im äußeren Bereich der A-Bande überlappen sich Aktin und Myosin, wobei im Inneren der A-Bande nur Myosin zu finden ist, in der I-Bande befindet sich das Aktin, Abbildung erstellt mit entnommenen und modifizierten Grafiken von [6]
- Skelettmuskulatur in der Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Skelettmuskelzellen im Querschnitt, immunhistochemische Anfärbung der Muskelfasertypen, rot flureszierender Sekundärantikörper (maximale Emission 590nm) $\triangleq$ Typ I, grün flureszierender Sekundärantikörper (maximale Emission 520nm) $\triangleq$ Typ II A, blau/ungefärbt flureszierender Sekundärantikörper (maximale Emission 450nm) $\triangleq$ Typ II B; Schnittdicke: $8\mu\text{m}$; 20fache Vergrößerung, Maßstab $\triangleq 50\mu\text{m}$, histologisches Bild aus der eigenen Forschungsarbeit

Die Querstreifung (Abb.2) entsteht durch eine periodische Abfolge von helleren und dunkleren Streifen, die auch als Banden bezeichnet werden. Die Banden werden nach ihrer Lichtbrechung unter dem Polarisationsmikroskop als A-Bande (anisotrop lichtbrechend) und I Bande (isotrop lichtbrechend) bezeichnet [3],[7],[10]. In der Ultrastruktur finden sich in der A-Bande vor allem parallel ausgerichtete Myosinfilamente [11], die aus einem Schwanzteil und einer Kopfdomäne bestehen und einen Abstand von ungefähr 45nm [3] zueinander haben, was die strenge Ordnung der Myofilamente unterstreicht. Im jeweils äußeren Drittel der A-Bande sind beidseitig die Kopfdomänen des Myosin Moleküls lokalisiert. Gemäß der periodischen Abfolge von A und I Banden wird die A-Bande logischerweise beidseits von I-Banden flankiert, die in der Ultrastruktur aus parallel angeordneten Aktinfilamenten bestehen [11],[7], [10]. Abhängig vom Kontraktionszustand der Muskulatur überlagern sich die Aktin- und Myosinfilamente mehr oder weniger, sodass folglich Aktin und Myosin aneinander vorbeigleiten [5], [8]. Die Aktinfilamente ragen bis in die äußeren Anteile der A-Bande, sodass der in der Mitte liegende Bereich ausschließlich aus Myosinfilamenten ohne Kopfdomäne und ohne Aktinfilamente besteht, daher erscheint dieser Bereich lichtmikroskopisch heller. Am M-Streifen, bestehend aus Proteinen wie Myomesin, M-Linie Proteine und

Kreatinkinase, sind die Myosinfilamente mittig im Sarkomer verankert [3],[10]. Mittig in der I Bande findet man eine schmale dunkle Linie, die sogenannte Z-Scheibe. Diese Z- Scheibe definiert die äußeren Grenzen eines Sarkomers, sodass ein Sarkomer aus zwei I- Banden und einer mittig liegenden A- Bande besteht [3],[10]. In der Z Scheibe sind die Aktinfilamente mittels Proteine wie beispielsweise α -Aktinin, Z-Protein oder Vinculin befestigt [5]. Die Myofibrillen bestehen aus vielen aneinandergereihten Sarkomeren, die damit die kontraktile Grundeinheit der Myofibrillen bilden. Unter physiologischen Bedingungen und im Ruhezustand messen die Sarkomere ungefähr 2,2 -2,5 μ m [12],[10]. Bei einer Muskelkontraktion verkürzen sich die beiden I- Banden, die A- Bande hingegen bleibt in ihrer Länge konstant [3], [11], [10].

Die beachtliche Kraft der Skelettmuskulatur erklärt die Notwendigkeit dieser strikten Anordnung der einzelnen Proteine. Dabei sind um ein Myosinfilament je sechs Aktinfilamente angeordnet und jedes Aktinfilament ist mit zwei Myosinfilamenten assoziiert [3]. Da Aktin und Myosin die Kraftentwicklung ermöglichen, ist es nicht verwunderlich, dass die beiden Myofilamente ungefähr 70%-80% des gesamten Proteingehalts einer Muskelfaser ausmachen [1].

1.1.2 Zytoskelett und Strukturproteine

Damit die mechanische Kraft, die aus der Interaktion von Aktin und Myosin resultiert, auch auf die Umgebung und das knöcherne Skelett übertragen werden kann, spielen die Strukturproteine sowie das Sarkolemm eine entscheidende Rolle [13]. An der Übertragung der mechanischen Kraft von der Muskelfaser auf das Endomysium und schließlich auf die Sehnen sind die Costamere beteiligt. Die Costamere sind Proteinkomplexe, die das Sarkolemm stabilisieren und in Höhe der Z- Scheiben ringförmig um die Muskelfaser verlaufen [3]. Damit ermöglichen die Costamere und die damit assoziierten Intermediärfilamente eine mechanische Verbindung der Sarkomere der Muskulatur mit der extrazellulären Matrix beziehungsweise der Basallamina der Muskulatur, wodurch Kräfte von den Sarkomeren auf das extrazelluläre Gewebe, aber auch von dem extrazellulären Gewebe auf die Sarkomere, übertragen werden können [14], [13]. Das erklärt, dass Defekte der Costamer- Proteine auch zu einer Muskeldystrophie führen können [14]. Costamere bestehen aus multiplem Proteinen, beispielsweise aus dem Dystrophin-Glykoprotein Komplex und dem Vinculin–Talin–Integrin Komplex, die beide große Bedeutung für die Muskelfunktion haben [15]. Über den Dystrophin Glykoprotein Komplex kommt es nicht nur zu einer Stabilisierung der Zellmembran, vielmehr stellen diese Proteine eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem filamentären Aktin und somit den kontraktilelementen her [14],[16],[17]. Auch Vinculin und Talin sind Proteine des Zytoskeletts und essenziell für die Bindung des Aktins an die Plasmamembran sowie Bestandteil der Costamere [16]. Die Costamere gehören zu hochspezialisierten *Adherens Junctions* der Muskelfasern, die eine Kontaktzone zwischen Sarkolemm und den Myofibrillen bilden und auch an der Kraftübertragung der Muskulatur beteiligt sind [16],[17]. Damit ist das Zytoskelett von großer Bedeutung und verleiht den Muskelzellen eine erhöhte Stabilität, indem es als mechanisches Stützgerüst dient, was aber dennoch eine Änderung der Form ermöglicht [3]. Auch das Intermediärfilament Desmin ist Bestandteil der Costamere [13],[3]. Desmin trägt durch die Verbindung der kontraktile Myofilamente mit dem Sarkolemm zur strukturellen Stabilität der Zelle während der Kraftübertragung bei [14],[13]. Es kann also durch die Verbindung des Zytoskeletts mit dem Sarkolemm bei einer Kontraktion zu einer Verkleinerung des intrazellulären Raumes kommen.

1.1.3 Sarkoplasmatisches Retikulum

Im Muskelgewebe wird das endoplasmatische Retikulum als sarkoplasmatisches Retikulum (SR) bezeichnet und besitzt eine besondere Funktion und Morphologie. Das SR in der Muskulatur besteht aus

membranhüllten Schläuchen, die parallel zur Längsachse der Muskelfaser angeordnet sind und daher auch als Longitudinal System (L-System) bezeichnet werden. Es umspannt die Myofibrillen und die einzelnen Schläuche sind netzförmig miteinander verbunden. Eine weitere Besonderheit betrifft das Sarkolemm, das schlanke sowie schlauchförmige Einstülpungen bildet und auch als Transversaltubuli oder kurz T-System bezeichnet wird [3],[18]. Das schlauchförmige SR tritt in enge räumliche Nähe zu den Transversaltubuli und bildet im Bereich des T-Tubulus zirkulär um die Myofibrillen laufende terminale Zisternen. Die longitudinalen Sarkotubuli des sarkoplasmatischen Retikulums münden schließlich in die terminalen Zisternen in der Nähe des T- Systems [3]. Die Transversaltubuli sind immer quer zu den longitudinalen Tubuli des L-Systems orientiert. In enger räumlicher Beziehung zu den Transversaltubuli finden sich jeweils zwei der terminalen Zisternen des SR, was auch als Triade bezeichnet wird [5], [1] und eine besondere Bedeutung für die elektromechanische Kopplung hat. (Abb. 3)

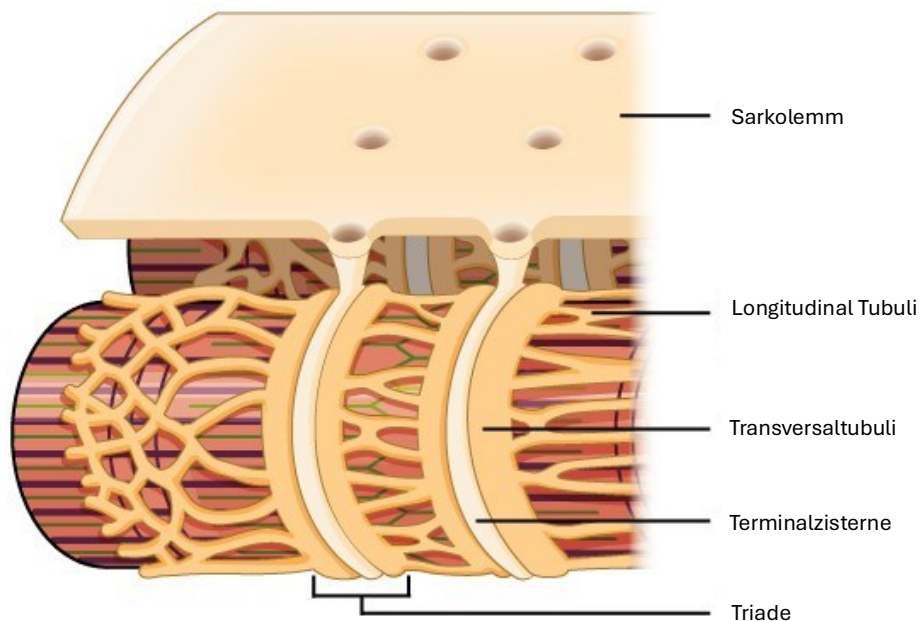


Abb. 3 Tubulussystem des sarkoplasmatischen Retikulums

Darstellung des Tubulussystems der Skelettmuskulatur, der longitudinale Tubulus geht in die Terminalzisterne über, die in enger räumlicher Nähe zum Transversaltubulus liegt, aus zwei Terminalzisternen zusammen mit einem Transversaltubulus ergibt sich die sogenannte Triade, der Transversaltubulus ist aufgrund seiner Anatomie dazu geeignet, die Erregung über Ca^{2+} Freisetzung in die Tiefe der Muskulatur fortzuleiten, worüber eine schnelle Erregung der gesamten Muskulatur ermöglicht wird; modifiziert nach OpenStax, Anatomy and Physiology <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/references>, Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> [9]

Die Bestandteile der Triade sind über junctionale Kanalkomplexe verbunden, die die terminalen Zisternen mit dem T-Tubulus verbinden und bei der elektromechanischen Kopplung von hoher Relevanz sind. Die Brückenproteine bestehen aus zwei verschiedenen Proteinen, dem spannungssensiblen Dihydropyridinrezeptor am T-Tubulus und dem Ryanodinrezeptor in der Membran der Terminalzisternen; wobei der Ryanodinrezeptor einen speziellen Kalziumkanal darstellt [3],[19]. Die Funktion des SR ist die Speicherung von Kalzium [1],[19]. Bei einer Änderung des Membranpotentials durch ein Aktionspotential, wird diese Änderung vom spannungssensiblen Dihydropyridinrezeptor erfasst. Dadurch verändert sich seine Konformation, was sich dann auf den Ryanodinrezeptor überträgt, sodass dieser durchlässig für Kalziumionen (Ca^{2+}) wird und diese aus dem SR in das Zytosol der Zelle strömen können [19],[3].

1.2 Die Sarkomerproteine Aktin, Myosin und Titin

Aktin und Myosin

Zum Verständnis der Filamentgleittheorie ist ein grobes Verständnis über die Eigenschaften der Proteine Aktin und Myosin hilfreich. Aktin und Myosin werden in der Muskulatur stark exprimiert und sind durch ihre Anordnung zueinander hauptsächlich an der Ausbildung der Sarkomere beteiligt [8], [7], [10].

Die Interaktion von Aktin und Myosin stellt die elementare Grundlage der Muskelkontraktion dar. Das filamentäre Aktin besteht in der Ultrastruktur aus ca. 400 globulären Aktinmonomeren (G-Aktin), die sich nach ATP-Hydrolyse zu einer doppelsträngigen Helix (F-Aktin) zusammenlagern [20],[21]. In regelmäßigen Abständen sind dem filamentären Aktin wichtige Regulatorproteine wie Tropomyosin und Troponin angelagert [12].

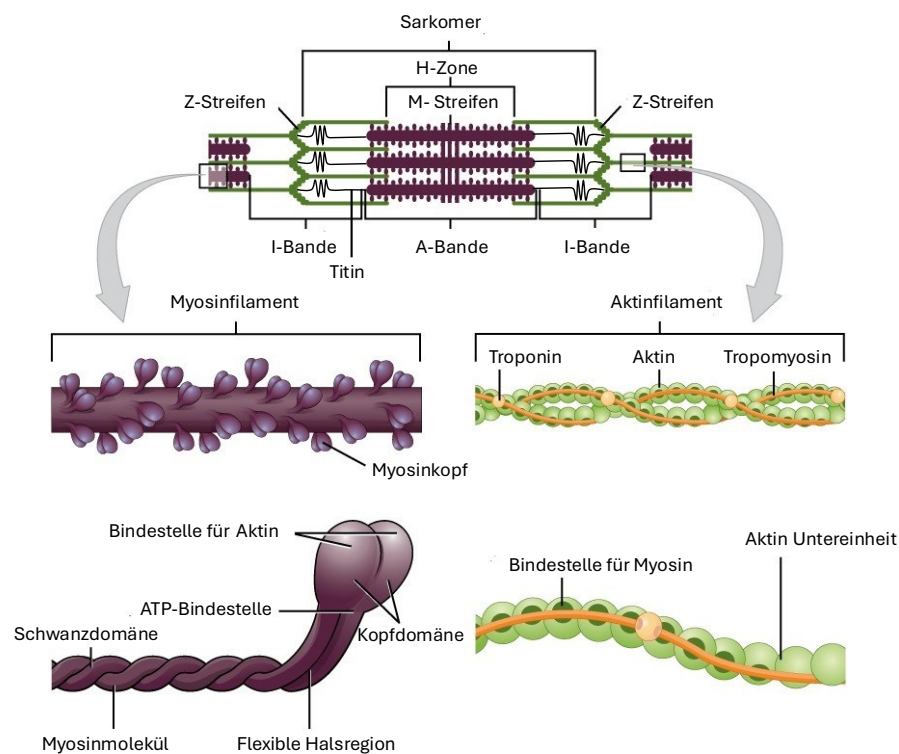


Abb. 4 Aktin- und Myosinfilamente und ihre Anordnung

Dargestellt ist der molekulare Aufbau der beiden Myofilamente Aktin und Myosin sowie ihre Interaktion miteinander, im Sarkomer wird deutlich, dass Aktin als eine Art Gerüst dient, an dem Myosin entlang gleiten kann; am Aktin sind die regulatorischen Proteine und deren Position dargestellt, dabei sind Troponin und Tropomyosin wichtige Proteine für die Regulation des Querbrückenzyklus, am Myosinfilament ist die Anordnung der wichtigen Kopfdomäne sowie die Zusammenlagerung der Schwanzregion dargestellt, exemplarisch sind die jeweiligen Bindestellen für den Querbrückenzyklus markiert, es wird deutlich, dass es mehrere Bindestellen am Aktin gibt, sodass das Myosin Molekül nach Konformationsänderung durch ATP-Hydrolyse an einer differierenden Bindestelle des Aktin- Moleküls binden kann und es dadurch zu einer Änderung der Sarkomer Länge kommen kann. Abbildung modifiziert nach OpenStax, Anatomy and Physiology

<https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/references>, Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>; [9]

Da Myosin und seine Isoformen eine entscheidende Rolle für die Muskelfunktion spielen, werden im Folgenden kurz die Ultrastruktur des Myosins (Abb.4) und die Unterschiede der Myosin Isoformen erläutert. In der Muskulatur kommt vor allem Myosin Typ II vor und ist dort als molekularer Motor zusammen mit Aktin für die Kraftentwicklung verantwortlich [3],[22]. Ein einzelnes Myosin Molekül ist ein Hexamer bestehend aus sechs Polypeptidketten, die dem Gewicht nach in schwer und leicht eingeteilt werden. Das Hexamer besteht insgesamt aus zwei schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von 220 kilo Dalton (kDA) und vier leichten Myosinketten mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDA [12],[22]. Die schweren Ketten bestehen aus einem Schwanzteil, einem Halsstück und einer globulären Kopfdomäne, wobei die Schwanzteile der beiden schweren Ketten umeinandergeschlungen sind und auf diese Weise eine stabförmige Struktur bilden [12],[3]. Im Myosinfilament bilden die umeinandergeschlungenen Schwanzteile des Myosin Moleküls das Rückgrat der Myosinfilamente aus dem seitlich die Kopfdomänen herausragen, die damit an die benachbarten Aktinfilamente binden können (Abb. 4) [12]. Eine katalytische Domäne im Kopfteil des Moleküls kann ATP hydrolysieren und zeitgleich an Aktin binden, was auch als Querbrücke bezeichnet wird [12], [3].

1.2.1 Titin als drittes Myofilament

Neben den beiden Myofilamenten Aktin und Myosin gibt es mit Titin ein weiteres drittes Myofilament mit elementar wichtiger Funktion für die Stabilität des Sarkomers sowie der Überlappung von Aktin und Myosin, insbesondere bei Längendehnung der Muskulatur. Titin ($0,6\mu\text{m}$ - $1\text{-}2\mu\text{m}$) verbindet die Myosinfilamente im Zentrum der A-Bande mit dem Z- Streifen und stabilisiert darüber die Sarkomere. Das Titinfilament (Abb. 5) reicht damit beidseits vom Z- Streifen bis in die Mitte des Sarkomers [23], [24],[25]. Die stabilisierenden Eigenschaften können an einer Arbeit von Huxley und Hanson verdeutlicht werden. Nach Extraktion von Aktin und Myosin aus den Sarkomeren behielten die Sarkomere ihre Länge und nach Längendehnung kehrten diese auf die Ursprungslänge zurück, was verdeutlicht, dass Titin neben stabilisierenden auch elastische Eigenschaften besitzt [11]. Somit hält Titin über die N-terminale Bindung an den Z- Streifen und die C-terminale Bindung an die Myosinfilamente [23], die Filamente Aktin und Myosin in Position zueinander und erlaubt damit die korrekte mikroskopische Ausrichtung [26]. Gemäß seinen elastischen und stabilisierenden Eigenschaften lässt sich das Titinprotein in einen Bereich mit eher steiferen Eigenschaften, gebunden an Myosin in der A Bande, und einen Bereich mit elastischeren Eigenschaften in der I- Bande unterteilen [26], [27], [28]. Durch die eben benannten Eigenschaften des Titins werden die Myosinfilamente im Zentrum des Sarkomeres positioniert [26], [23], [29], was schließlich eine Überlappung der Aktin und Myosinfilamente ermöglicht.

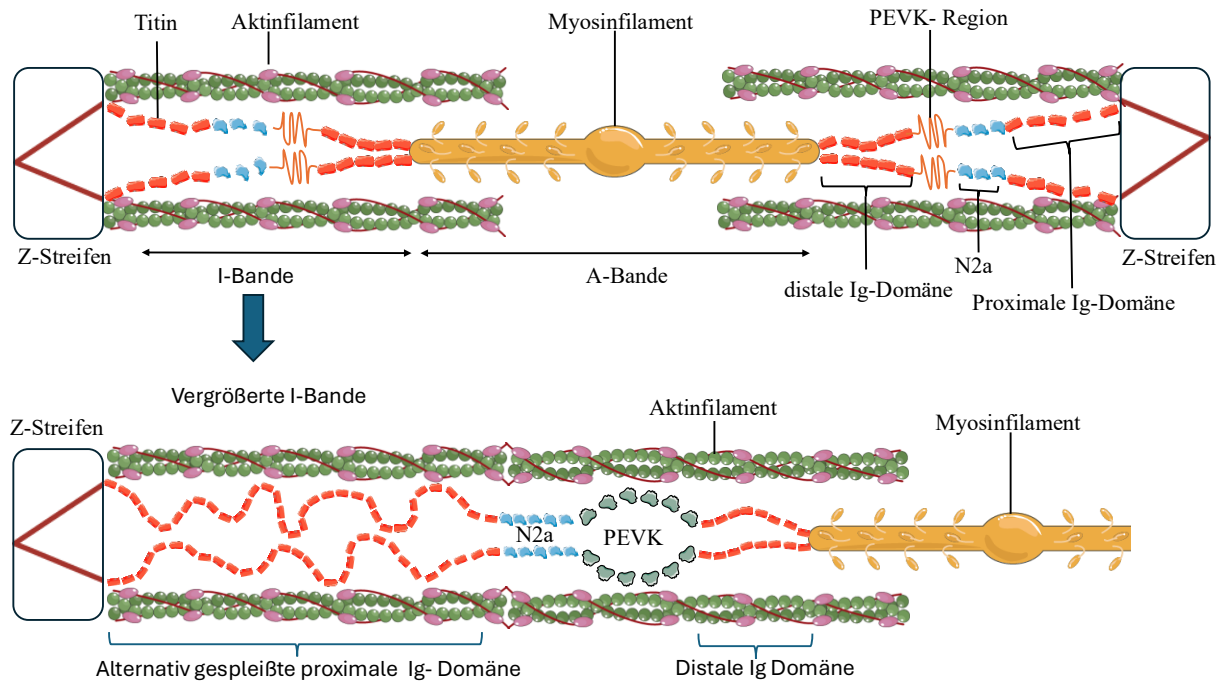


Abb. 5 Titin des Skelettmuskels,

dargestellt ist das Titin des Skelettmuskels mit seiner N2A Isoform sowie der PEVK-Region und der beiden Immunglobulin (Ig) ähnlichen Domänen, Befestigung am Z Streifen beidseits sowie am Myosinfilament, weiterhin sichtbar sind die beiden Myofilamente Aktin und Myosin. Zusätzlich dargestellt ist die A-Banden Region des Titins und eine Großansicht der I-Banden Region des Titins, Abbildung erstellt mit entnommenen und modifizierten Grafiken von [6], Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Titin, als größtes Protein des Menschen [23],[30], hat über seine gesamte Länge hinweg unterschiedliche Funktionen, die sich auch auf molekularer Ebene wiederfinden. Das Protein besteht zum Großteil aus repetitiven Elementen, die sich aus Fibronectin Typ 3 in Kombination mit Immunglobulin ähnlichen Domänen oder nur aus Immunglobulin ähnlichen Domänen zusammensetzen. In der A-Bande enthalten die Bauelemente zum Teil auch Fibronectin Typ 3 Domänen [31],[32]. Die Anteile des Titins in der I-Bande setzen sich vor allem aus Immunglobulin ähnlichen Domänen ohne Fibronectin Typ 3 Domänen zusammen, welche mit den elastischen Eigenschaften sowie der Dehnbarkeit des Titins assoziiert sind [32]. Daraus ergibt sich auch die geringere Dehnbarkeit des Titins in der A-Bande im Vergleich zum Titin in der I- Bande.

Die elastischen Eigenschaften des Titins beruhen auf einer frei verlaufenden Domäne, die ähnlich einer spiraligen Feder aufgebaut [3] und von großer Bedeutung sind, da durch diese die Myofilamente nach einer Dehnung der Muskulatur in ihre ursprüngliche Position und somit in ihre ursprüngliche Überlappung zurückkehren und die erneute Kraftentwicklung ermöglicht wird [3],[11],[33],[34]. Dabei kann das Titin auf das dreifache der Ruhelänge gedehnt werden [27]. Die elastischen Eigenschaften liegen auf molekularer Ebene begründet. So besteht die elastische Region des Titins im Skelettmuskel (Abb.5) aus rund 100 Immunglobulin ähnlichen Domänen und einer einzigartigen PEVK- Region [31],[32],[35]. Die Namensgebung der PEVK- Region geht auf die dominierenden Aminosäuren Prolin (P), Glutamin (E), Valin (V) und Lysin (K) zurück [36]. Im Skelettmuskel ist die PEVK-Region größer als im Herzmuskel und besteht aus ca. 2174 Aminosäuren. Sie liegt zentral in der I-Bande und wird beidseitig flankiert von einer Immunglobulin ähnlichen Sequenz [35]. Die Immunglobulin ähnlichen Domänen treten als Tandems

auf und sind über eine flexibles Verbindungsstück aneinandergebunden [32]. Zusätzlich befindet sich zwischen den Immunglobulin ähnlichen Domänen und der PEVK- Region im Skelettmuskel noch die Exons der N2A Isoform (Abb. 5). Das humane Protein Titin besteht trotz seiner Größe aus nur einem, 364 Exons enthaltenden, Gen, das alternativ *gespliced* wird, sodass durch Exon *skipping* Isoformen unterschiedlicher Länge entstehen, von denen in der Skelettmuskulatur nur N2A vorkommt [23],[35],[33].

Das Titin ist aufgrund seiner elastischen Eigenschaften von großer Bedeutung für die passive Kraftentwicklung bei Dehnung der Muskulatur [29],[33]. Dafür sind die elastischen Eigenschaften und Rückstellkräfte des Titins verantwortlich, wozu die verschiedenen Komponenten des Titins in der I Bande einen unterschiedlichen Beitrag leisten. Unter physiologischer Dehnung der Sarkomere kommt es zunächst bei geringer Dehnungskraft zu einer Verlängerung der Verbindungsstücke der Immunglobulin ähnlichen Tandems auf das drei bis vierfache der Ursprungslänge [33], gefolgt von einer Längenzunahme der PEVK- Region bei größerer Dehnung [37],[38],[33]. Wie bereits beschrieben ist die PEVK-Region des Skelettmuskels länger als die des Herzmuskels, sodass sich daraus ergibt, dass Skelettmuskulatur auch dehnbarer ist als das Myokard. Andersherum ist das Titin des Myokards steifer als das Titin des Skelettmuskels [23]. Weiterhin ergibt sich ein inverser Zusammenhang zwischen Proteingröße des Titins und der passiven Kraft, die ein Muskel bei passiver Dehnung aufbringt [23]. Aufgrund der Länge der PEVK- Region im Skelettmuskel kann sich die Region auf bis zu 0,8µm ausdehnen, weshalb die Skelettmuskulatur wenig passive Kraft aufbringt [35]. Erst bei höheren Kräften und nachdem die Verbindungsstücke der Tandem Immunglobulin ähnlichen Domänen und die PEVK- Region gedehnt worden sind, tragen auch die Immunglobulin ähnlichen Domänen selbst zur Dehnbarkeit des Titins bei, allerdings erst bei unphysiologischen Kraftwerten [23], [38],[35]. Für die Elastizität des Titins wird ein Streben nach Entropie der einzelnen Bestandteile verantwortlich gemacht, aber auch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen in der PEVK-Region, was auch als entropische Feder bezeichnet wird [39],[40]. Die passive Elastizität des Titins ermöglicht sowohl dynamische als auch statische Stabilität der Sarkomere während Relaxation und Kontraktion [29].

Die Steifigkeit des Titins ist nicht nur zwischen Herz- und Skelettmuskulatur unterschiedlich, vielmehr kann auch zwischen langsamen und schnellen Muskelgruppen ein Unterschied ausgemacht werden, sodass die langsameren Muskelgruppen (z.B. M. soleus) weniger steif sind als die Schnelleren. Abgeleitet aus dem physikalischen Hooke'schen Gesetz geht eine erhöhte Steifigkeit mit einer erhöhten Rückstellkraft einher [41]. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass steifere Muskelgruppen die Ausgangslänge nach Dehnung schneller erreichen, was als funktionelle Anpassung an die schnellere Kraftentwicklung verstanden werden kann.

Aus der geringen Steifigkeit resultiert eine höhere, notwendige Sarkomer Länge für den Anstieg der passiven Spannung [23],[39],[42], was auf unterschiedliche Längen der Immunglobulin ähnlichen Domänen und PEVK- Region, abhängig vom alternativen Spleißen (Abb.5), zurückgeführt wird [42], [33]. So finden sich beispielsweise im M. soleus 90 Tandem Immunglobulin Wiederholungen und 2174- Aminosäuren in der PEVK- Region [36], im Titin des Myokards jedoch lediglich 37 Tandem Immunglobulin Wiederholungen und eine 163 Aminosäuren lange PEVK- Region [42].

1.2.2 Titin modulierte Steifigkeit der Skelettmuskulatur

Titin hat einen Anteil von 51%-56% an der gemessenen Steifigkeit der Skelettmuskulatur und damit einen entscheidenden Einfluss innerhalb der physiologischen Grenze der Sarkomer Länge von <3,2µm. Oberhalb der Sarkomer Länge von 3,2 µm macht Kollagen den Großteil des Einflusses auf die Steifigkeit der Muskulatur aus [23],[43]. Damit ist ein Zusammenhang zwischen Steifigkeit der Skelettmuskulatur und der Sarkomer Länge hergestellt, wobei Titin eine große Rolle spielt [23]. Die Steifigkeit des Titins ist jedoch nicht konstant und kann über multiple Mechanismen reguliert werden. Darunter ist vor allem die posttranslationale Phosphorylierung der PEVK-Region zu nennen, die auch in dieser Arbeit in den Fokus

gerückt worden ist. Neben der posttranslationalen Modifikation kann die Steifigkeit auch über Glutathionierung oder Acetylierung sowie die Bindung von *Heat Shock Proteinen* in der I-Bande beeinflusst werden [23].

Viele Untersuchungen fanden dabei an Herzmuskulatur statt, jedoch ist dies nicht direkt auf die Skelettmuskulatur zu übertragen, da sich die Titin Isoformen in den beiden Gewebearten unterscheiden. So ist die N2A Isoform in der Skelettmuskulatur größer als die N2B Isoform, die nur im Myokard vorkommt [33]. Aus der vorherigen Ausführung ergibt sich dadurch ein Unterschied der elastischen Eigenschaften des Titins, wodurch eine Übertragbarkeit erschwert ist, dennoch lassen sich daran die Mechanismen der Modulation verdeutlichen. Beispielsweise führt eine Phosphorylierung der N2B Titin Isoform im Herzen zu einer Abnahme der Titin Steifigkeit [44]. Im Skelettmuskel führt eine Phosphorylierung der PEVK- Region durch die Proteinkinase Ca (PKC α) zu einer Zunahme der Steifigkeit des Titins [45]. Somit ergibt sich abhängig von der Position der Phosphorylierung ein differierender Effekt auf die elastischen Eigenschaften des Titins.

Bei der Modifikation der Steifheit des Titins spielt die PKC α eine Rolle. PKC α ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, die unter anderem durch die Phosphorylierung an Position T497 aktiviert werden kann, was nachfolgend eine Autophosphorylierungskaskade in Gang bringt, die zu einer Erhöhung der Proteinkinase Aktivität führt. Außerdem ist die PKC α lipidsensitiv und die Aktivierungsmechanismen der Proteinkinase können unter anderem auch eine Lipid Hydrolyse induzieren [46]. So kann über die Wirkung von Insulin die Diacylglycerol (DAG) Konzentration erhöht werden, was dann zur Aktivierung der PKC α führen kann [47]. Neben DAG kann auch Ca^{2+} zur Aktivierung der PKC α beitragen [46],[47]. Aber auch unabhängig von der Insulinwirkung kann über DAG, anionische Lipide wie Phospholipide und Ca^{2+} eine Aktivierung der PKC α erreicht werden [46]. Intramuskuläre Fetttropfchen, auch *Lipid Droplets* (LD) genannt, sind von einer Monolayer Hülle (Abb.8) aus Phospholipiden umgeben und es kommt zu einer Akkumulation von DAG am Ort der LD Synthese [48], was potenziell die PKC α aktivieren kann und darüber Einfluss auf die Steifheit des Titins nehmen kann.

Die PKC α phosphoryliert die Position S11878 und S12022 der PEVK- Region des Titins und reguliert darüber die Steifigkeit. Nach Phosphorylierung der PEVK-Region durch die PKC α konnte eine Verkürzung der PEVK- Region beobachtet werden, was die erhöhte, passive Spannung und Steifigkeit erklären kann [45]. Der postulierte Mechanismus sind Querverbindungen innerhalb der PEVK- Region aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung durch die angefügte Phosphatgruppe [45],[23]. Weiterhin konnten Hidalgo et al zeigen, dass eine Behandlung mit Phosphatase den Effekt der Phosphorylierung rückgängig machen konnte, sodass eine Modulation der Steifigkeit reversibel ist und fortlaufend verändert werden kann [45]. Obwohl die Untersuchungen von Hidalgo et al an Myokard durchgeführt worden sind, ist das Ziel-Epitop der PKC α in allen Titin Isoformen exprimiert, sodass auch eine Untersuchung an der Skelettmuskulatur sinnvoll ist [45]. Einen weiteren Einfluss kann auch eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration in der Muskelzelle haben, so konnten Labeit et al zeigen, dass Ca^{2+} durch eine Interaktion mit der PEVK- Region die Titin basierte Spannung erhöht sowie die Länge der PEVK- Region verkürzt. Dabei bindet Ca^{2+} an Glutamin-reiche Regionen, führt zu einer Konformationsänderung und beeinflusst darüber die Länge der PEVK- Region [49].

1.3 Physiologie der quergestreiften Muskulatur

Der beschriebene histologische Feinbau des Muskelgewebes ist die Grundlage der komplexen physiologischen Abläufe bei der Muskelkontraktion und Kraftentwicklung. Die Anordnung der Aktinfilamente kann man sich wie ein Gerüst vorstellen (Abb.4), in dem die Myosinfilamente entlang gleiten, wodurch über eine Längenänderung der Sarkomere Kraft erzeugt werden kann [11]. Wenn sich die Länge des Muskels passiv oder aktiv ändert, gleiten Aktin und Myosin aneinander entlang ohne dass die

Proteine sich in ihrer Länge verändern [11], was auch als Filamentgleittheorie bezeichnet wird. Bei einer aktiven Verkürzung der Muskulatur werden die Aktin Filamente unter ATP Hydrolyse zwischen die Myosinfilamente gezogen [50]. Dabei gleitet Aktin in die A Bande hinein, sodass sich die Sarkomere verkürzen [11], [8], [3]. Da die Sarkomere ungefähr 2,2 -2,5µm (vgl. Kapitel 1.1.1) messen, muss sich die Verkürzung vieler Sarkomere addieren, damit eine Muskelverkürzung makroskopisch sichtbar wird. Andersherum werden die Aktinfilamente bei passiver Dehnung des Muskels zwischen den Myosinfilamenten heraus gezogen [11]. Ein entspannter gesunder Muskel ist in der Regel in vivo etwas über die Gleichgewichtslänge hinaus vorgedehnt, sodass ebenso das Titin gedehnt wird und die elastischen Rückstellkräfte des Proteins wirksam werden (vgl. Kapitel 1.2) [12].

Durch ankommende Aktionspotentiale wird die Membranspannung verändert, wodurch es zu einer Interaktion des Dihydropyridinrezeptors und Ryanodinrezeptors kommt. Diese Interaktion bedingt eine Erhöhung der Kalzium Konzentration, was somit die gezielte Steuerung der Muskelkontraktion ermöglicht (vgl. Kapitel 1.1.3), [19]. Der Querbrückenzyklus wird durch die Bindung von Ca^{2+} an den regulatorischen Troponin- Tropomyosin Komplex, der an das Aktinfilament gebunden ist, reguliert [51], [52]. Dabei blockiert Tropomyosin bei niedriger Ca^{2+} Konzentration in der Skelettmuskelzelle sterisch die Bindungsstelle von Aktin und Myosin, sodass dadurch zum einen der Querbrückenzyklus gehemmt wird und zum anderen konsekutiv die Muskelkontraktion verhindert wird [51],[53]. Bei Anwesenheit von Ca^{2+} bindet dieses an den Tropomyosin- Troponin Komplex, der sich daraufhin azimuthal um 25° bewegt und damit die Aktin- Myosin Bindungsstelle am Aktin frei gibt [51]. Das Gleiten der Myosinfilamente findet unter ATP-Verbrauch statt und wird auch als Querbrückenzyklus bezeichnet. Unter Ruhebedingung binden Aktin und Myosin fest aneinander, was auch als Rigorkomplex bezeichnet wird. Während des Querbrückenzyklus (Abb. 6) kommt es zu einer zyklischen Interaktion von Aktin und Myosin miteinander, wobei die Bindung des ATP an den Myosinkopf die feste Bindung zwischen Aktin und Myosin löst. Andererseits wird die ATPase im Myosinkopf durch die Bindung an Aktin aktiviert. Durch die folgende Hydrolyse des ATP in ADP und Phosphat in der globulären Kopfdomäne kommt es zu einer Konformationsänderung des Myosins, was eine erneute Bindung mit Aktin an einer anderen Position ermöglicht [50]. Die Dissoziation der Hydrolyseprodukte (ADP und Phosphat) führt wiederum zu einer Konformationsänderung. Durch die Konformationsänderungen kommt es zu einem Ineinandergleiten der beiden Myofilamente [12]. Der Querbrückenzyklus kann gleichzeitig an mehreren Myosin Molekülen ablaufen sobald Aktin und Myosin miteinander interagieren. Dadurch wird die chemische Energie der ATP Hydrolyse in mechanische Energie umgesetzt [50]. Der Querbrückenzyklus kann ablaufen und der Muskel kontrahieren, solange ATP und Ca^{2+} vorhanden sind [54]. Durch ein zyklisches Ablaufen des Querbrückenzyklus können Aktin und Myosin weiter ineinandergleiten und dadurch verkürzt sich das Sarkomer [50]. Je Zyklus kann sich das Sarkomer um bis zu 10nm verkürzen [12].

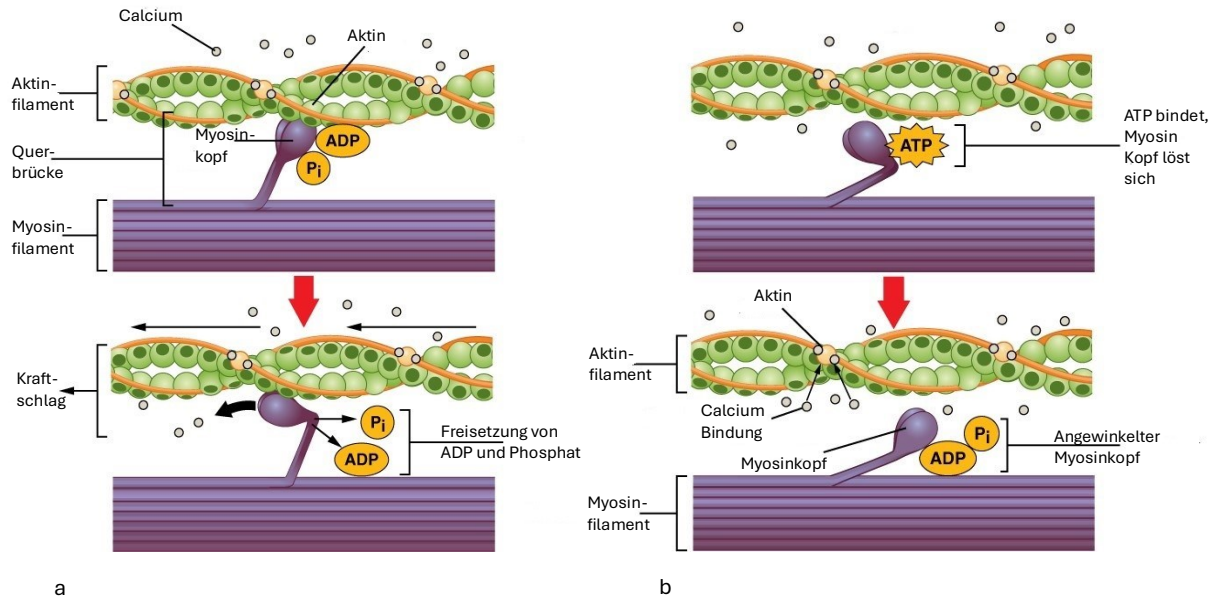


Abb. 6 Querbrückenzyklus

- Querbrückenbildung und Kraftschlag nach Bindung von Ca^{2+} an das an Aktin gebundene Troponin, kommt es zur Konformationsänderung von Troponin, dadurch wird die Bindungsstelle für den Myosinkopf freigegeben und es bildet sich eine Querbrücke zwischen dem Aktinfilament und der Kopfdomäne des Myosinfilaments; nach Abdissoziation von Phosphat (P_i) und dann Adenosindiphosphat (ADP) kommt es zu Kraftschlägen durch eine Konformationsänderungen im Myosinfilament, dadurch bewegt sich der Myosin Kopf ca. 10nm in Richtung M-Streifen.
- Lösung des Rigorkomplexes: in Abwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) löst sich Myosin nicht von der Bindungsstelle am Aktin, erst durch die Bindung von ATP an der globulären Kopfdomäne des Myosins löst sich die Querbrücke, es kommt im Anschluss zu Hydrolyse des Adenosintriphosphats durch die ATPase des Myosins, die dabei freiwerdende Energie führt zum Anwinkeln des Myosin Kopfes, ADP und P_i bleiben gebunden, nach Ca^{2+} -Bindung gibt Troponin die Bindestelle für Myosin wieder frei und der Querbrückenzyklus kann erneut ablaufen, dabei bindet Myosin an einer anderen Position auf dem Aktinfilament,

Abbildung modifiziert nach OpenStax, Anatomy and Physiology <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/references>, Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>; [9]

Die Kontraktion wird durch einen Abfall der Ca^{2+} -Konzentration beendet, sodass Ca^{2+} vom Troponin Tropomyosin Komplex ab diffundiert und es dann erneut zu einer Blockade der Aktin-Myosin Bindestelle kommt. Für die Absenkung der Ca^{2+} Konzentration gibt es mehrere Mechanismen. In der Membran des SR befindet sich eine Calcium-ATPase (SERCA), die unter ATP Hydrolyse Ca^{2+} in das SR pumpt, das damit einen Ca^{2+} Speicher darstellt [55]. Von der SERCA gibt es mehrere Isoformen, die meist gewebespezifisch und im Skelettmuskel abhängig der Muskelfasertypen exprimiert werden [55]. Eine weitere Rolle in der Regulation der Ca^{2+} Konzentration spielen aber auch der Golgi Apparat, die Plasmamembran sowie die Mitochondrien [56],[57]

1.4 Fasertypen

Fasertypen und deren Zusammensetzung im Muskel können heterogen und variabel sein, so bestehen unterschiedliche Muskelgruppen aus einer unterschiedlichen Zusammensetzung an Muskelfasertypen [58],[59],[60]. Man kann zwischen Typ-I und Typ II Muskelfasern unterscheiden, die sich in Eigenschaften, wie der Energiegewinnung unterscheiden. Die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Fasertypen erlauben Muskelaktivitäten mit unterschiedlichen mechanischen und metabolischen Anforderungen [1],[22], sodass der selbe Muskel je nach Verteilung der Muskelfasertypen für Haltearbeit, repetitive submaximale Kontraktion (Fortbewegung) oder für Schnelkraft durch maximale Kontraktion

genutzt werden kann [58]. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Muskelfasern sind jedoch flexibel und können sich als Reaktion auf neuronale oder hormonelle Einflüsse verändern [58],[59]. Abhängig von der Stimulationsdauer und der Frequenz der Aktionspotentiale, verändert sich die Expression der Muskelfasertypen in den motorischen Einheiten [58], sodass motorische Einheiten größtenteils aus identischen Fasertypen bestehen [61].

Muskelfasern können also in ihrer Funktion sehr unterschiedlich sein und sich auch hinsichtlich der Mitochondrien- Anzahl, der Myoglobin Menge, des Gehalts von Lipidtropfen sowie der Menge oxidativer Enzyme unterscheiden, was letztlich auch die Funktion beziehungsweise die Art und die Dauer der Kraftentwicklung beeinflusst [3]. So korreliert auch die Geschwindigkeit der Ermüdung mit dem histochemischen Typ der Muskelfaser [61].

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen Typ I und Typ II Muskelfasern, wobei Typ I Fasern auch als langsame beziehungsweise Typ-S-Fasern (*slow*) und Typ II Fasern als schnelle beziehungsweise als Typ-F-Fasern (*fast*) bezeichnet werden [3]. Weiter kann man zwischen den Fasertypen I, IIA, IIB und IID unterscheiden, die jeweils eine andere Isoform der schweren Myosinkette (MHC I, IIA, IIB, IID) exprimieren, welche den jeweiligen Muskelfasertypen zugeteilt worden sind [59]. Die S- und F-Muskelfasertypen enthalten unterschiedliche Myosin Isoformen. Die Typ F-Fasern enthalten die Myosin schwere Kette Isoformen IIA, IIB und IID, wohingegen in S-Typ Muskelfasern bevorzugt die Myosin Isoform I exprimiert wird [59]. Morphologisch kann man Typ I und Typ II Fasern bereits anhand ihrer Farbe unterscheiden, da Typ I Fasern eher rot und Typ II Fasern eher weiß erscheinen. Das lässt sich vor allem auf den unterschiedlichen Gehalt an Myoglobin zurückführen, das für die rote Farbe verantwortlich ist, und in größerer Menge in Typ I Fasern enthalten ist [3],[58].

Typ I Fasern greifen zur Energiegewinnung vor allem auf den aeroben oxidativen Stoffwechsel zurück und enthalten daher viele Mitochondrien und oxidative Enzyme sowie vermehrt Lipidtropfen als Energiespeicher. Aufgrund der aeroben Energiegewinnung ermüden die Muskelfasern langsam, weshalb diese sich als Haltemuskulatur eignen und somit vor allem für die Körperhaltung relevant sind [3],[62]. Frontera und Ochala haben zusammengefasst, dass die Geschwindigkeit der Ermüdung abhängig von der Dichte der Mitochondrien ist [1],[62].

Typ II Fasern hingegen haben einen hohen Energiebedarf, der nur kurzfristig durch den aeroben Stoffwechsel gedeckt werden kann; weshalb die Typ II Fasern schnell ermüden und somit nur für kurze Zeit maximal aktiv sein können. Typ II Fasern decken ihren hohen Energiebedarf vor allem über die Glykolyse, wozu reichlich Glykogen und viele glykolytische Enzyme enthalten sind [3]. Edström und Kugelberg haben schon 1968 gezeigt, dass Typ II Fasern schneller ermüden als Typ I Fasern, was unter anderem durch die unterschiedliche Energiegewinnung erklärt werden kann [61].

Da sich auch Typ II Muskelfasern in ihrer Energiegewinnung und auch Ermüdung unterscheiden, wird dieser Muskelfasertyp anhand der Myosin Adenosintriphosphatasen (ATPase) zusätzlich in die Subklassen IIA und IIB unterteilt. Man kann zwischen schnell ermüdenden und ermüdungsresistenten Typ II Muskelfasern unterscheiden. Die schnellemüdenden motorischen Einheiten enthalten bevorzugt die Typ IIB Muskelfasertypen, wohingegen die ermüdungsresistenten Typ II Muskelfasern vermehrt aus Fasern des Typs IIA bestehen. Aber sowohl die Typ IIA als auch die Typ IIB Fasern enthalten eine große Anzahl an glykolytischen Enzymen, sodass beide Typen zur Energiegewinnung zu großen Teilen die Glykolyse nutzen können. Im Vergleich ermüden die ermüdungsresistenten Typ II Fasern dennoch schneller als die Typ I Fasern [58]. Die ermüdungsresistenten Typ IIA Fasern können dabei neben der Glykolyse auch über den oxidativen Stoffwechsel Energie gewinnen. Zudem weisen die Typ IIA Fasern im Gegensatz zu den Typ IIB Fasern eine höhere Mitochondrien Dichte auf, was den Unterschied in der Ermüdung erklären kann [62].

Eine Analyse der oxidativen Kapazität anhand der Citrat Synthase als Marker für den Mitochondrien Gehalt sowie eine Korrelation dieser mit dem Muskelfasertyp ergab, dass die Typ IIA Fasern den größten Gehalt an Mitochondrien und daher die größte oxidative Kapazität unter den Muskelfasertypen besitzen; gefolgt von Typ I > IID/X > IIB [63]. Analog zum Energiebedarf der Muskelfasern erzeugen Typ II Fasern im Allgemeinen eine hohe Kraft aber ermüden rasch, wohingegen Typ I Fasern weniger Kraft entwickeln aber langsam ermüden.

	Muskelfasertyp I	Muskelfasertyp IIA	Muskelfasertyp IIB
ATP-Umsatz	Niedrig	Hoch	hoch
Mitochondrien Anzahl	Viele	Viele	wenig
Energiegewinnung	Oxidative Phosphorylierung	Oxidative Phosphorylierung/ Glykolyse	Glykolyse
Substrat	Lipide /LD	Lipide oder Glykogen bzw. Glucose	Glykogen/Glucose
Myoglobin Gehalt	Hoch	Hoch	niedrig
Ermüdung	Langsam	mittel	Schnell
Belastungsdauer	Lang	Mittel	kurz
Kraftentwicklung	Niedrig	Stark	Stärkste Fasertypen

Tabelle 1 Eigenschaften der Muskelfasertypen

Zusammenfassung der Eigenschaften der Muskelfasertypen in tabellarischer Form

Die unterschiedlichen Eigenschaften der Fasertypen (vgl. Tabelle 1) lassen sich auch auf molekularer Ebene wiederfinden. So exprimieren die langsamen Typ I Fasern vor allem auch langsame Myosin Isoformen, sodass der Adenosintriphosphat (ATP)- Umsatz und damit auch der Querbrückenzyklus verlangsamt ablaufen, was dazu führt, dass pro verbrauchtem ATP ein längerer Kraftbeitrag erzeugt werden kann [12],[62]. Daher eignen sich diese Muskelfasertypen vor allem für die Haltearbeit [12].

Im Vergleich zu den Typ I-Fasern exprimieren die Typ II-Fasern schnellere Myosin Isoformen, was zur Folge hat, dass der Querbrückenzyklus schneller abläuft, sodass pro verbrauchtem ATP ein kürzerer Kraftbeitrag erzeugt werden kann. Da auch die Verkürzungsgeschwindigkeit bei den Typ-II Fasern größer ist, sind diese Fasern vor allem in Muskelgruppen zu finden, die schnelle Muskelbewegungen ausführen und dadurch weniger für Haltearbeit geeignet [12]. Allerdings wird die Heterogenität der Muskelfasertypen nicht nur durch unterschiedliche Myosin Isoformen und die Art der Energiegewinnung, sondern auch durch alle anderen Bestandteile der Zellstruktur und -funktion, wie zum Beispiel der Kalziumhomöostase, bestimmt [58].

Die ATPase Aktivität des Myosins bestimmt die Geschwindigkeit der Muskelkontraktion [64]. Weiterhin kann eine Korrelation zwischen der ATPase Aktivität der jeweiligen Myosin Isoform mit der Verkürzungsgeschwindigkeit sowie mit der Kontraktionsdauer hergestellt werden. So ist die ATPase Aktivität der langsamen Muskelgruppen, wie z.B. des M. soleus, zwei- bis dreimal niedriger als die Aktivität der ATPase von schnellen Muskelgruppen, wie beispielweise des Musculus Extensor digitorum longus (EDL) [65],[22],[64]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass schnelle und langsame Muskelfasern eine unterschiedliche Myosin Isoform besitzen und diese Isoformen sich in ihren ATPase Aktivitäten unterscheiden [59]. Es scheint einen Zusammenhang zwischen der exprimierten Myosin Isoform und der aufgebrachten Muskelkraft zu geben (vgl. Tabelle 1). Die spezifische Kraft, definiert als gemessene Kraft normiert auf den Muskelquerschnitt, ist zumeist in langsamen Muskelfasertypen geringer als in schnellen Muskelfasertypen [22].

In dieser Arbeit wird der M. soleus im Mausmodell untersucht. Dies hat den Hintergrund, dass der M. soleus der Maus zur Hälfte aus Typ I Fasern besteht [59], die vermehrt Enzyme zur Oxidation von Fettsäuren exprimieren und vermehrt LD einlagern [66]. Die andere Hälfte der Muskelfasern besteht aus Typ IIA- und IID-Fasern. In geringer Anzahl kommen auch Typ IIB Fasern vor [59]. Obwohl in Typ I und Typ IIA Fasern im Vergleich zu Typ IIB Fasern vermehrt Fettsäure Oxidation zur Energiebereitstellung

betrieben wird und auch vermehrt Fettsäure oxidierende Enzyme exprimiert werden sowie vermehrt Mitochondrien vorkommen, lässt sich vor allem in Typ I Fasern beim Menschen eine vermehrte intramuskuläre Fetteinlagerung nachweisen, was paradox erscheint, da durch die hohe oxidative Kapazität in diesen Fasertypen die Fettsäuren eher metabolisiert als gespeichert werden sollten. Komiya et al. nahmen daher an, dass der Fettsäure Import in die Muskelzellen, die Triglyzerid Synthese als auch die LD-Bildung in Typ I Fasern im Vergleich zu Typ II Fasern hochreguliert sind [66].

1.5 Muskelkraft und Ermüdung

Nachdem die anatomischen und physiologischen Grundlagen der Muskelkontraktion beschrieben worden sind, werden nachfolgend relevante Einflüsse auf die Muskelkraft sowie der Mechanismus der Muskelermüdung dargestellt.

Die Menge der möglichen Querbrückenzyklen bestimmt die Kraft der Muskulatur. Daher hat die Sarkomer Länge auch einen Einfluss auf die Muskelkraft. Ab einer Sarkomer Länge $>2,2\mu\text{m}$ nimmt die Muskelkraft linear ab [67], da auch die Überlappung von Aktin und Myosin abnimmt. Die höchste Kraft kann daher in der Sarkomer Position aufgebracht werden, in der alle Aktin und Myosinfilamente miteinander interagieren können ($2,0\mu\text{m}$ - $2,2\mu\text{m}$) [67]. Aber auch unterhalb von $2,0\mu\text{m}$ kommt es zu einer Abnahme der Kraft, beispielsweise durch eine beginnende Doppelüberlappung von Aktin und Myosin [12]. Das Titinfilament ist durch seine enge Assoziation an Myosin im A-Band maßgeblich daran beteiligt eine optimale Überlappung von Aktin- und Myosinfilamenten zu ermöglichen [29],[24],[23].

1.5.1 Frequenz- Kraft Zusammenhang

Die aufgebrachte Kraft eines Skelettmuskels ist von vielen Faktoren abhängig, unter anderem auch von der Stimulationsfrequenz [68]. Da die Dauer der mechanischen Muskelkontraktion als Antwort auf ein Aktionspotential deutlich länger andauert als ein Aktionspotential selbst, können noch während der initialen Muskelantwort weitere Aktionspotentiale ausgelöst werden, die sich dann überlagern und dadurch zu einer größeren mechanischen Antwort führen. Dieser Zusammenhang wird auch als Superposition bezeichnet. Eine Serie von Aktionspotentialen mit kurzem Zeitabstand ($< 1/3$ der Dauer einer Einzelzuckung) führen schließlich durch Superposition zu einer tetanischen Kontraktion, die um das 10fache stärker sein kann als die Einzelzuckung (Abb. 7a). Die Stimulationsfrequenz, die eine tetanische Kontraktion auslöst, wird auch Verschmelzungsfrequenz genannt und variiert abhängig von der Muskelgruppe [12].

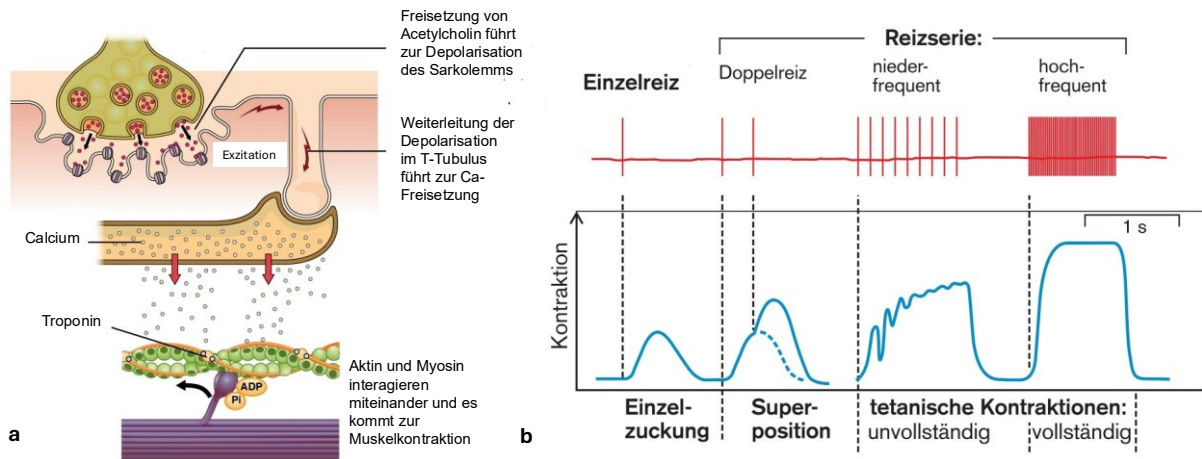


Abb. 7 Kalzium Freisetzung und tetanische Muskelkontraktion

- Durch ein Aktionspotential kommt es zur Freisetzung von Acetylcholin (ACh) an der motorischen Endplatte. Das ACh bindet an nikotinerge Acetylcholin Rezeptoren und führt dadurch zu einer Depolarisation, die dann über den T-Tubulus weitergeleitet wird. Es kommt zu einer Kalzium Freisetzung. Dadurch wird die Aktin Myosin Interaktion ermöglicht und es kommt zur Muskelkontraktion; Abbildung modifiziert nach OpenStax, Anatomy and Physiology <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/references>, Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>; [9]
- Dargestellt ist hier die Muskelantwort auf einen Einzelreiz sowie auf eine Reizserie. Schematisch wird deutlich, dass es durch eine Reizserie zu einer Superposition der Einzelzuckungen kommt, was in einer deutlich stärkeren tetanischen Muskelkontraktion resultiert. Verantwortlich hierfür ist eine höhere Kalzium Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum; Abbildung modifiziert nach Physiologie Pape H, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2023 [12]

Die im Vergleich zur Einzelzuckung höhere tetanische Kraft (Abb. 7b) korreliert eng mit einer durch die höhere Stimulationsfrequenz bedingten größeren Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [68],[69],[70]. Neben der größeren Ca^{2+} -Freisetzung nennt MacDougall noch eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität oder eine verbesserte Funktion des Querbrückenzyklus als mögliche Gründe für die größere Kraft bei einer höheren Stimulationsfrequenz [68]. Zudem kann es zu einer aktivitätsabhängigen Potenzierung der Muskelkraft kommen, die auf einer Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins beruht und eine erhöhte Beweglichkeit des Myosinkopfes bedingen kann, der damit näher an das Aktinfilament gelangt und somit bereits bei niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Myosin-Aktin Interaktion führt. [71]. Die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins erfolgt durch die Myosin Leichte Ketten Kinase, die zuvor durch Calmodulin und einen erhöhten Ca^{2+} -Spiegel aktiviert worden ist [72]. Durch vorhergehende Muskelarbeit wird die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle erhöht und die Myosin Leichte Ketten Kinase aktiviert. Die daraus folgende Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinkette erhöht die Muskelkraft. Diese Phosphorylierung bleibt bestehen, bis die langsam arbeitende Myosin Leichte Ketten Phosphatase die Phosphorylierung abspaltet, sodass durch vorherige Muskelarbeit eine erhöhte Kraft ermöglicht wird [73].

1.5.2 Auswirkung von Titin auf die aktive Muskelkraft

Titin hat nicht nur einen Einfluss auf die passive Kraft der Muskulatur, sondern auch auf die aktive Kraft der Muskulatur. Eine Aufgabe von Titin ist es die Myofilamente Aktin und Myosin in Position zueinander zu halten und damit eine optimale Interaktion dieser miteinander zu ermöglichen [23]. Durch den beschriebenen Mechanismus der molekularen Sprungfeder kann Titin, die Sarkomer Länge nach Dehnung über Rückstellkräfte wieder herstellen [74]. Dabei haben längere Titin Isoformen eine geringere passive Spannung als kürzere Isoformen und damit weniger Rückstellkraft [75]. Die Titinsteifigkeit hat über die

Zunahme der Kontraktionskraft nach Längendehnung der Sarkomere einen Einfluss auf die Muskelkraft, was auch als längenabhängigen Aktivierung (LDA) bezeichnet wird [76], [23]. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der LDA der Muskulatur und der Steifigkeit der Muskulatur hergestellt werden, sodass der Grad der LDA mit dem Grad der Steifigkeit der Muskulatur korreliert. Titin macht einen großen Teil der Muskelsteifigkeit aus, sodass das Protein einen Einfluss auf die LDA hat [23],[43],[77]. So ist die Titin basierte Spannung in der Lage, die Länge der Myosinfilamente zu verändern, aber auch den interfilamentären Abstand der A- Bande und des Z-Streifens [77]. Dabei ermöglicht die anatomische Anordnung des Titins die Übertragung von Spannung auf das Myosinfilament, abhängig von der passiven Spannung des Titins [77]. Durch eine Muskeldehnung verändert sich die Position der Myosin- und Aktinfilamente zueinander, was den Muskel für die Kontraktion vorbereitet. Der Muskel kommt dadurch in einen sogenannten *primed* Zustand, was funktionell unter anderem mit einer Zunahme der Ca^{2+} Sensitivität einhergeht. Darüber kommt es zu einer vergrößerten Kraftproduktion [76],[78] Eine Dehnung des Sarkomers führt auch zu einer Dehnung des Titins und ist mit einer Zunahme der passiven Kraft des Titins assoziiert. Dies korreliert mit einer Veränderung der Myofilament Strukturen hin zum *primed* Zustand, da Titin die Spannung auf das Myosinfilament übertragen kann [76],[77]. Durch die Dehnung der Myosinfilamente werden die Myosinköpfe in einen *primed* Status überführt und je mehr Myosinköpfe in diesem Zustand sind, desto größer ist die Kraftentwicklung [77],[76]. Neben der Dehnung des Sarkomers und des Titins kann die Muskulatur auch ohne Längenänderung über Phosphorylierung beispielsweise der regulatorischen Myosin leichten Kette, in einen *primed* Zustand überführt werden [76],[77].

1.5.3 Ermüdung

Unter Muskelermüdung versteht man die Reduktion der aufgebrauchten Muskelkraft nach einer repetitiven Stimulation über eine längere Dauer. Ursachen für eine Ermüdung können eine Veränderung der Erregungsweiterleitung, eine Störung der motorischen Endplatte oder auch die Akkumulation von Metaboliten wie H^+ oder anorganisches Phosphat sein. Dies führt schließlich zu einer geringeren Anzahl an ablaufenden Querbrückenzyklen oder aber zu einer geringeren Kraft je Querbrückenzyklus [68]. Metabolite wie H^+ oder Laktat können zu einer Azidose in der Muskelzelle führen, die die Muskelkraft ebenso reduzieren kann [70].

Allerdings hat auch bei der Ermüdungsreaktion des Muskels die Ca^{2+} - Konzentration einen Einfluss, sodass die Abnahme der Muskelkraft mit einer reduzierten Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle oder aber einer geringeren Ca^{2+} - Sensitivität einhergehen kann [79],[70]. Da Ca^{2+} , wie bereits beschrieben, über Calmodulin die Myosin Leichte Kette Kinase aktivieren kann und dies die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinkette begünstigt, wird diese bei verringerter Ca^{2+} - Konzentration nun vermindert phosphoryliert und weniger Muskelkraft kann aufgebracht werden [72].

Allen et al. untersuchten 1989 die Kalziumkonzentration während einer Ermüdungsreaktion in der Muskulatur. Dabei konnten sie feststellen, dass es zunächst zu einem Anstieg der Ca^{2+} - Konzentration während Muskelstimulation kam, im weiteren Verlauf aber zu einem deutlichen Abfall der Ca^{2+} - Konzentration, der mit einer Ermüdung einhergeht [70]. Weiterhin konnten Allen et al zeigen, dass während einer Muskelermüdung die Ca^{2+} - Konzentration innerhalb des Myoplasmas langsamer abfällt als vor der Ermüdung und dies zu einer langsameren Relaxation der Muskulatur führte [70]. Unterstützt wurde dieser Zusammenhang durch die Beobachtung, dass die Erholung der Muskulatur durch Ca^{2+} - Konzentration erhöhende Mechanismen beschleunigt werden konnte [70]. Zudem diskutierten Rassier und Macintosh, dass auch eine verminderte Ca^{2+} - Sensitivität des Troponin I zur Muskelermüdung beiträgt [79]. Zusätzlich kommt es bei repetitiver Muskelstimulation auch durch Akkumulation von Metaboliten und einer Azidose zu einer Abnahme der Ca^{2+} - Sensitivität in der Muskelzelle [70].

Aber auch die Versorgung der Muskelzellen mit Nährstoffen zur ATP-Generierung ist von entscheidender Bedeutung für die Ermüdungsreaktion in der Muskelzelle, denn jede Muskelaktivität benötigt für den Querbrückenzyklus ATP als Energiequelle. Die Generierung von ATP kann in der Muskelzelle zunächst schnell, aber nur kurzfristig, über Kreatinphosphat erfolgen. Eine weitere, aber langsamere Möglichkeit der Energiegewinnung ist die anaerobe Glycolyse, die Glycogen beziehungsweise Glucose als Substrat nutzt, aber weniger effektiv ist als die langsamere ATP- Gewinnung über aerobe Mechanismen, die in den Mitochondrien stattfinden und Glucose oder Fett als Substrate nutzt. Bei Muskelaktivität fallen allein schon durch den zyklisch ablaufenden Querbrückenzyklus immer auch ADP und Phosphat Ionen an, die dann in der Zelle akkumulieren. Weiterhin fallen, bei Nutzung der anaeroben Glycolyse zur Energiegewinnung, zusätzlich Laktat und Wasserstoffionen (H^+) an, die den pH-Wert in der Zelle abfallen lassen. Diese Metabolite haben wie bereits erwähnt Auswirkungen auf die Effizienz des Querbrückenzyklus [80]. In vivo werden die Muskeln über eine bei Belastung gesteigerte Blutversorgung [81] mit Substraten und Sauerstoff versorgt, dies ist in vitro nicht möglich, sodass der Substratgehalt in der Muskelzelle vor Tiertötung eine Auswirkung auf die Muskelermüdung haben könnte.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Ermüdungsresistenz abhängig von Fasertypzusammensetzung mit dementsprechender oxidativer Kapazität, dem Gehalt an Mitochondrien sowie der Blutversorgung ist [82].

1.6 Metabolismus und Energieversorgung der Skelettmuskulatur

Als Energiequellen zur ATP-Erzeugung dienen der Skelettmuskulatur Glukose und Lipide. Die Glukose, überwiegend aus der Glykogenolyse gewonnen, wird in der Glykolyse anaerob unter Entstehung von Laktat zu ATP umgesetzt, wohingegen Fettsäuren durch oxidative Phosphorylierung alaktazid zu ATP verstoffwechselt werden [12],[83].

1.6.1 Die Rolle der *Lipid Droplets* in der gesunden Muskulatur

Da die Muskelkontraktion ATP abhängig ist [50], ergibt sich für die Muskulatur ein hoher Energiebedarf [66]. Neben Glucose sind Lipide eine wichtige Energiequelle zur Bereitstellung von ATP [84],[85],[86]. Die intramuskulären Lipide sind typischerweise in *Lipid Droplets* (LD) gespeichert, die wie Zellorganellen im Zytoplasma liegen und Lipide speichern sowie bei Bedarf freigeben [2],[84]. LDs entstehen im Endoplasmatischen Retikulum und sind rundliche Strukturen, die von einer *Monolayer* aus amphiphilen Phospholipiden umgeben (Abb.8) sind und im Inneren die Lipide speichern [87],[88],[48],[84]. In den LDs finden sich vor allem Triacylglycerine (TAG), gefolgt von Cholesterin(ester) (CE) oder DAG [84],[89]. Die Bildung der LDs wird durch Enzyme der TAG-Synthese moduliert [2],[84].

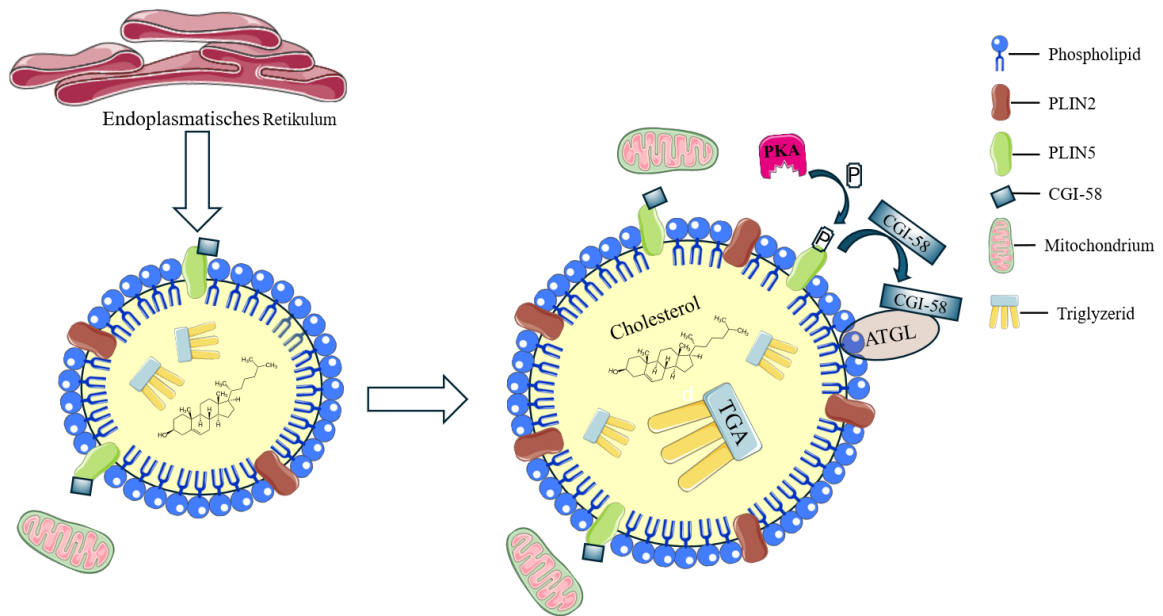


Abb. 8 Schematische Darstellung von Lipid Droplets, Perilipinen und der Regulation der Lipidoxidation

Die *Lipid Droplets* (LD) entstehen im endoplasmatischen Retikulum und können wie dargestellt eine unterschiedliche Größe aufweisen, der Lipidkern wird von einem *Monolayer* aus Phospholipiden umgeben und enthält vor allem Triacylglycerine (TAG) und Cholesterol. Im Phospholipid Monolayer sind die relevanten Perilipine (PLIN) dieser Forschungsarbeit dargestellt, es wird ersichtlich, dass PLIN2 vermehrt auf größeren LD vorkommt. Die PKA phosphoryliert PLIN5 und dadurch wird CGI-58, das an PLIN5 gebunden vorliegt frei; dieses bindet dann an die Adipozyten Triglyzerid Lipase (ATGL) und aktiviert diese. Dadurch wird die Verstoffwechslung der Lipide gestartet. In enger räumlicher Nähe zu den LD finden sich Mitochondrien, wobei PLIN5 eine Verbindung zu diesen herstellt und damit ein direkter Weg zur Versorgung der Mitochondrien mit Lipiden für die β -Oxidation besteht; Abbildung modifiziert und erstellt mit Grafiken von Servier Medical Art [6], Lizenz unter: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Auf der Phospholipid Oberfläche der LDs finden sich Proteine, die als Perilipine (PLIN) bezeichnet werden und eine Rolle in der Bildung, Wachstum oder Verstoffwechslung der LDs spielen können [87] [90] [89]. Perilipine sind eine Proteinfamilie, die sich an die LD anlagern und aus insgesamt fünf Proteinen bestehen (PLIN1-5), deren Verteilung gewebespezifisch ist. So wird PLIN 5 vor allem in oxidativem Gewebe wie zum Beispiel dem M. soleus gefunden [89]. Abhängig von der Art der gespeicherten Lipide finden sich unterschiedliche Konzentrationen der Perilipin Formen. So wird auf LDs, die vor allem TAGs enthalten, überwiegend PLIN5 und PLIN1 gefunden, wohingegen PLIN2 wenig oder keine Assoziation zu TAGs oder Cholesterinester enthaltenden LDs haben [89]. Bosma beschrieb in ihrer Übersichtsarbeit, dass PLIN2 über eine Stabilisierung der LDs und Hemmung der Lipolyse die Speicherung von intramuskulärem Fett unterstützt. Zudem soll PLIN2 möglicherweise an der Synthese von LDs beteiligt sein [84]. Weiterhin wird beschrieben, dass eine PLIN 5 Überexpression im Skelettmuskel zu einer erhöhten Speicherung von LD, einer erhöhten Genexpression oxidativer Proteine und einer erhöhten Stoffwechselrate führt. PLIN5 fungiert als PPAR δ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) Target [84], welches als Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor die Glukose und Lipid Verstoffwechslung durch Erhöhung der mitochondrialen Funktion sowie der Fettsäure oxidierenden Reaktionswege steigert [91],[92]. Zudem gibt es Hinweise auf eine negative Beeinflussung der Insulinsensitivität durch PLIN 5 am Skelettmuskel [84].

Die LDs haben also vor allem eine Speicherfunktion für verschiedene Lipide und leisten damit einen Beitrag zur Energieversorgung der Muskulatur [93],[94],[86],[84]. Turner et al. haben an *tissue engineered* Skelettmuskel nach Inkubation mit unterschiedlichen Dosen eines Fettsäuren Gemischs zeigen können,

dass die intrazellulären LDs in Größe und Anzahl bereits nach vier Tagen zunehmen [95]. Ebenso kann die Speicherfunktion anhand einer Zunahme der intramuskulären Lipide nach HFD sowie bei Adipositas verdeutlicht werden [86],[82],[85],[96],[97]. Die in den LDs gespeicherten Lipide werden über Degradation der TAG in der Lipolyse zu Energie umgewandelt. Dabei spielt die Adipozyten Triglycerid Lipase (ATGL) eine entscheidende Rolle [98],[99]. Auf der Oberfläche von LDs findet sich neben Perilipinen auch *comparative gene identification-58* (CGI-58), was ein Co-Aktivatoren der ATGL darstellt, der in oxidativem Gewebe exprimiert wird. ATGL kann durch PLIN 5 aber auch durch CGI-58 mittels Protein- Protein Interaktion auf der Oberfläche der LDs rekrutiert und aktiviert werden. Dabei hemmt die Interaktion der ATGL mit PLIN5 die Lipolyse, wohingegen die Interaktion mit CGI-58 die Lipolyse induziert. PLIN2 und 5 können CGI-58 binden, wohingegen PLIN2 nicht mit der ATGL interagiert. Nach Phosphorylierung von PLIN5 durch die Proteinkinase A kommt es zu einer dreifachen Erhöhung der Lipolyse, ohne dass CGI-58 oder/und ATGL dabei phosphoryliert werden [98]. Dies führt zu dem Schluss, dass nach Phosphorylierung von PLIN5 der Co-Aktivatoren CGI-58 (Abb. 8) freigesetzt wird und es infolgedessen zu einer Erhöhung der Lipolyse kommt [100]. ATGL katalysiert den ersten Schritt der Lipolyse, wobei TAG zu DAG gespalten werden. Die DAG werden dann wiederum durch die hormonsensitive Lipase zu Monoacylglycerinen gespalten [99],[101]. Die hormonsensitive Lipase wird wiederum ebenso Proteinkinase A abhängig nach Bindung an Perilipine oder andere Proteine auf der LD-Oberfläche aktiviert, sodass auch hierüber eine Regulation der Lipolyse erfolgt.

Lipide werden vor allem bei längeren und moderaten Aktivitäten in der Muskulatur verstoffwechselt [84], weshalb auch Sportler einen erhöhten Gehalt an LDs in der Skelettmuskulatur haben. Dies impliziert, dass es durch physikalisches Training zu einem Anstieg der intramuskulären Lipide kommt, jedoch können dabei keine negativen Effekte wie beispielsweise eine Insulinresistenz nachgewiesen werden, die mit einem erhöhten intramuskulären Lipidgehalt bei Adipositas assoziiert ist. Dies wird als *Athletes Paradox* bezeichnet [102],[103]. Als Erklärung dafür wurde eine erhöhte oxidative Kapazität in der Muskulatur der Sportler im Vergleich zu adipösen oder an Diabetes mellitus Typ II erkrankten Individuen angenommen [103], denn das Maß der Fettsäure Oxidation während einer körperlichen Belastung korreliert mit einer netto Reduktion der Zahl der LDs [104]. Während des Trainings kommt es mit zunehmender Dauer zu einer Abnahme der Kohlenhydrat Oxidation, wohingegen die Oxidation der Lipide signifikant ansteigt. Dies korreliert mit einem deutlich niedrigeren Gehalt an intramuskulären Lipiden nach der Belastung im Vergleich zu den Werten vor der Belastung. Dies bedeutet, dass während längerer Muskelarbeit (hier über zwei Stunden) die intramuskulären Fettspeicher verstoffwechselt werden [94],[105]. Zudem ist nach körperlicher Aktivität der Kontakt zwischen Mitochondrien und LDs erhöht und das unabhängig von Adipositas oder einer Diabetes mellitus Typ II Erkrankung [104]. Dabei liegt ein Großteil der LDs zwischen den in der Muskelzelle stark geordneten Mitochondrien und hat einen sehr engen Kontakt mit diesen [106],[102], was als direkter Pfad für die Versorgung der Mitochondrien mit Fettsäuren im Rahmen der β -Oxidation angesehen wird [104],[107]. Die erhöhten intramuskulären Lipidspeicher nach physikalischem Training spiegeln die Rolle der LDs in der Energieversorgung des Muskels wider [102],[105], was die physiologische Rolle der LDs in der gesunden Muskulatur sowie die Rolle der Skelettmuskulatur in der Energiehomöostase verdeutlicht. Somit haben die LDs in gesunder Muskulatur die physiologische Funktion die Energieversorgung der arbeitenden Muskulatur sicher zu stellen und damit auch einen Einfluss auf die Lipid Homöostase des Organismus [102]. Ebenso konnte eine positive Korrelation zwischen intramuskulärem Lipidgehalt und der maximalen Leistung hergestellt werden [94].

Ein weiterer Mechanismus der Regulation des Fettsäuremetabolismus stellt die Pyruvatdehydrogenase (PDH) und Pyruvatdehydrogenasekinase 4 (PDK4) dar. Über PDH kann die Glucose oder Fettsäure Oxidation reguliert werden, denn PDH konvertiert Pyruvat zu Acetyl-CoA und erhöht darüber die Einspeisung von Acetyl-CoA aus der Glykolyse in den Citratzyklus. PDK4 kann über Phosphorylierung die Aktivität der PDH hemmen, sodass vermehrt Acetyl-CoA aus der β -Oxidation in den Citratzyklus eingespeist wird. Dadurch wird die Glykolyse herunter reguliert und die Fettsäure Oxidation erhöht [108].

Turner et al zeigten, dass mit dem Anstieg der LDs durch erhöhtes Angebot von Fettsäuren auch die PDK4 Expression anstieg, was mit einer Induktion der Fettsäure Oxidation einhergeht [95],[109]. Neben PDK4 wurden auch noch weitere Gene der Lipid- Oxidation durch ein Überangebot an Fettsäuren induziert, beispielsweise PGC-1 α , sodass das Überangebot von Lipiden zu einer Hochregulation der Gene zur Metabolisierung derselbigen führt [109].

1.6.2 Perilipin 5 – Ein Überblick

PLIN5 wird vor allem auf oxidativen Skelettmuskelgruppen wie dem M. soleus exprimiert [110]. Die Expression von PLIN5 kann durch viele Einflüsse moduliert werden [100], unter anderem auch durch die Bindung von Fettsäuren an den PPAR δ , was zu einer vermehrten Expression von PLIN5 führt. Damit kann durch eine HFD eine Erhöhung der Expression der Perilipine erreicht werden [110]. Dieser Prozess kann als Anpassung der Muskulatur an das erhöhte Fettsäure Angebot verstanden werden, da durch die vermehrte Synthese der PLIN die Muskulatur in der Lage ist, vermehrt LD einzulagern. So kann in Muskelgruppen, die vor allem oxidativen Fettstoffwechsel betreiben, die Versorgung der Muskulatur im Bedarfsfall gesichert werden [110],[100],[98].

PLIN5 im Skelettmuskel fördert die Expression von Genen, die unter der Kontrolle von PPAR α und PGC-1 α stehen, und hat darüber einen positiven Einfluss auf die mitochondriale Oxidation sowie den Fettsäuremetabolismus. Andererseits wurde bei PLIN5 Überexpression auch eine Zunahme der LD-Größe beobachtet [111]. PLIN5 trägt also zu einer vermehrten Speicherung der Lipide in LDs bei und kann damit einen protektiven Effekt in Bezug auf die Insulinsensitivität haben, bedingt durch die Aufnahme toxischer Lipide in die LDs [112],[111],[113],[114]. PLIN5 hemmt die ATGL und damit die Lipolyse, sodass PLIN5 einen bedeutenden Einfluss in der Regulation des Fettsäurestoffwechsels hat [113],[100],[98],[112]. Weiterhin ist PLIN5 mit einer erhöhten oxidativen Kapazität assoziiert [112],[114],[84].

Eine weitere Funktion von PLIN5 ist es den Kontakt mit den Mitochondrien herzustellen und darüber direkt TAG und Fettsäuren zur Verstoffwechslung an die Mitochondrien zu liefern, wodurch PLIN5 zur Verstoffwechslung von Lipiden beiträgt [115],[116],[104],[117].

1.6.3 Perilipin 2 – Ein Überblick

PLIN2 wird ubiquitär exprimiert und befindet sich zusammen mit PLIN5 auf den LD [98], wobei sich die beiden Perilipine an unterschiedlichen Positionen befinden [117]. PLIN2 ist dabei eins der am häufigsten exprimierten LD-Proteine [118]. Ebenso wie PLIN5 hat auch PLIN2 eine Funktion in der Regulation der Lipolyse und Oxidation von Lipiden. So hemmt PLIN2 die Bindung von ATGL an die LD und schützt darüber vor einer Abnahme der LD. PLIN 2 findet sich daher vor allem auf sehr großen LDs und mit erhöhter Expression von PLIN2 findet man eine Reduktion der ATGL [115]. Daher ist PLIN2 mit einer Stabilisierung der LD assoziiert [84]. Aber eine Kombination aus PLIN2 und 5 auf der Oberfläche führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass die LD während Muskelaktivität zur Energiegewinnung verbraucht werden [104].

Eine PLIN2 Überexpression führt zu einer starken Zunahme von intramuskulärem Fett. Die Expression von PLIN2 kann die Speicherung von intramuskulären Lipiden in Form von LD erleichtern und darüber möglicherweise vor eine Lipotoxizität schützen. Zusätzlich konnte auch eine Verbesserung der Insulinsensitivität bei PLIN2 Überexpression beobachtet werden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass PLIN2 bei einem erhöhten Lipid Angebot, vermehrt exprimiert wird [118]. Neben seiner Rolle für die Speicherung der Lipide in Form von LD [119], ist PLIN2 aber auch an der Regulation der oxidativen Phosphorylierung beteiligt. Bei einem PLIN2 Mangel werden daher zwar weniger LD gespeichert, die

Enzyme der oxidativen Phosphorylierung jedoch vermehrt exprimiert. Das erscheint sinnvoll, da Lipide bei PLIN2 Mangel nicht mehr gespeichert werden können und dafür schneller oxidiert werden [118]. PLIN2 ist damit essenziell für die LD-Bildung und Speicherung von intramuskulären Lipiden [118].

1.7 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus beschreibt eine Reihe metabolische Erkrankungen, die in gemeinsamer Endstrecke durch eine Hyperglykämie charakterisiert sind. Die Hyperglykämie entsteht durch eine Störung der Insulinsekretion, der Insulinwirkung, was auch als Insulinresistenz bezeichnet wird, oder einer Kombination aus beidem [120]. Unabhängig davon, ob die Insulinsekretion oder die Insulinwirkung beeinträchtigt ist, kommt es zu einer diagnostisch relevanten Hyperglykämie. Die Diagnostik erfolgt über die Bestimmung der Nüchternplasmaglukose (NPG)- Werte nach achtstündiger Nahrungskarenz oder des Hämoglobin A1C (HbA1C) Wertes mit definierten Grenzwerten. Zusätzlich kann auch ein oraler Glukose Toleranz Test zur Diagnostik durchgeführt werden. Ein NPG- Wert $>126\text{mg/dl}$, ein HbA1C $>6,5\%$ oder ein Blutzuckerwert $>200\text{mg/dl}$ im oralen Glukosetoleranz Test sind die diagnostischen Kriterien [121],[122]. Glykiertes HbA1c entsteht durch nicht enzymatische Bindung von Glukose an Hämoglobin, was bei hohen Blutglukose Spiegeln vermehrt stattfindet. Dadurch kann der prozentuale Anteil des glykierten HbA1C am Gesamthämoglobin zur Diagnostik des Diabetes mellitus genutzt werden.

1.7.1 Epidemiologie

Die Relevanz der Erkrankung ergibt sich aus der Epidemiologie. Weltweit leiden laut Zahlen der World Health Organisation (WHO) von 2014 rund 422 Millionen Menschen an Diabetes Mellitus, wobei Diabetes mellitus Typ II einen Hauptteil der Erkrankten ausmacht [123],[124]. Dramatisch ist der Anstieg der altersadjustierten Mortalitätsrate um 3% in den Jahren 2000 bis 2019. Auch aktuelle Zahlen aus einer Erhebung der Krankenkassen in Deutschland von März 2024 stellen einen Anstieg der an Diabetes mellitus Typ II erkrankten Patienten auf 7,29 Millionen (+95.450) im Zeitraum von 2021 bis 2022 fest [125]. Aufgrund der Schwere der Folgeerkrankungen sind dies gravierende Zahlen, die die Bedeutung der Erkrankung unterstreichen. Auch langfristig betrachtet zeigt sich dieser Trend. Von 1997 bis 2020 ist die Prävalenz des Typ II Diabetes mellitus in Deutschland um 3,7% auf 8,9% gestiegen [126]. Schätzungen der Prävalenz in Deutschland für das Jahr 2016 kommen auf eine Gesamtanzahl an Diabetes mellitus Typ I Erkrankten von 373000 [127]. Dies zeigt die völlig unterschiedlichen Dimensionen zwischen Typ I und Typ II Erkrankungen. Schätzungen zu Folge beträgt die weltweite Prävalenz rund 8,4 Millionen Erkrankter an Diabetes mellitus Typ I mit einer geschätzten Mortalität von ungefähr 175 000 [128].

Zudem kann ein weiterer Anstieg der Typ II Erkrankung erwartet werden. Denn ein überwiegend sitzender Lebensstil in Kombination mit fettreicher Ernährung führt zu Übergewicht und ist mit einer Insulinresistenz assoziiert [82]. Durch verringerte Bewegung nimmt die Muskelkraft ab, dies führt zu immer weniger Bewegung, was in mehr Übergewicht resultiert, was dann wiederum mit Insulinresistenz assoziiert ist [129],[97],[86],[129]. So ergeben Schätzungen eine Zunahme der Prävalenz für Diabetes Mellitus Typ II in Deutschland bis 2040 eine Zunahme von 21%, was 1,4 Millionen zusätzliche Erkrankte allein in Deutschland bedeutet [130]. Schätzungen für die Zunahme von Diabetes mellitus Typ I Erkrankungen bis 2040 ergeben weltweit einen Anstieg um 66%-106% auf 13,51 – 17,4 Millionen Erkrankte [128].

Allein in Deutschland wurden im Jahr 2020 7,4 Milliarden Euro als direkte Krankheitskosten von Diabetes mellitus angegeben, was auch die enorme ökonomischen Relevanz der Erkrankung verdeutlicht [131].

1.7.2 Pathophysiologie Diabetes Mellitus Typ I und II

Anhand der Ätiopathogenese kann man das Krankheitsbild Diabetes mellitus in mehrere Typen einteilen, wobei die häufigsten der Diabetes mellitus Typ I und II sind [120]. Für das Verständnis dieser Arbeit wird die zugrundeliegende Pathophysiologie der beiden Diabetes Typen im Folgenden kurz erläutert.

Diabetes mellitus Typ I

Diabetes mellitus Typ I ist deutlich seltener im Vergleich zum Typ II Diabetes mellitus [123],[124]. Die Ätiologie bestehend aus genetischer Veranlagung und Umwelteinflüssen ist multifaktoriell [132],[124]. Pathophysiologisch kommt es durch eine zellvermittelte, autoimmune Reaktion zur Zerstörung der β -Zellen im Pankreas, sodass daraus abhängig von der Schwere der Autoimmunreaktion ein absoluter Insulinmangel entstehen kann [132]. Daher kann man bei Diagnosestellung oft auch Autoantikörper als diagnostisches Kriterium nutzen [133],[134]. Die Erkrankung manifestiert sich meist im Kinder- und Jugendlichenalter, kann aber auch erst im Erwachsenenalter auftreten [135]. Durch den Insulinmangel kommt es bei dieser Form des Diabetes mellitus oft schnell zu einer Ketoazidose oder zu Symptomen wie beispielsweise einer Polyurie oder Polydipsie, sodass die Erkrankung meist früh erkannt wird [120],[121]. Glukose wird nicht mehr so effizient in die Muskulatur und andere Gewebe aufgenommen, sodass der Energiebedarf zunächst durch Lipolyse und β -Oxidation gedeckt wird. Durch eine hohe Konzentration von freien Fettsäuren in Kombination mit Insulinmangel kann es jedoch zu einer Überlastung des Citratzyklus kommen, sodass Acetyl CoA stattdessen zu Ketonkörper verstoffwechselt wird, was in einer bedrohlichen Ketoazidose resultieren kann [136].

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ I hat die Reduktion von Mortalität und Morbidität zum Ziel und wird meist über den individuell festgelegten HbA1C Zielwert, unter Abwägung von individuellen Risiken, Nebenwirkungen und Nutzen der Therapie, gesteuert. Elementare Bestandteile der Therapie in Deutschland sind Schulungen, Glukoseselbstkontrolle, Ernährungsanpassung, psychosoziale Betreuung und die Insulintherapie abhängig von der Insulinsensitivität und Restproduktion des Pankreas [135].

Diabetes mellitus Typ II

Die Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ II unterscheidet sich grundsätzlich von der des Diabetes Mellitus Typ I. So steht im Zentrum der Pathophysiologie bei Diabetes mellitus Typ II die Insulinresistenz und langfristig auch eine Abnahme der körpereigenen Insulinsekretion [126],[137]. Bereits eine Dekade vor Ausbruch der Erkrankung und der Diagnosestellung lässt sich eine verringerte Insulinsensitivität sowie eine veränderte Glukoseaufnahme feststellen. Es besteht also noch vor der Manifestation der Erkrankung eine Insulinresistenz. Zu Beginn der Erkrankung kommt es zu einer vermehrten endogenen Insulinsekretion, die als Kompensation der verminderten Insulinwirkung und Glukoseaufnahme verstanden werden kann. So besteht eine inverse Korrelation zwischen Insulinsensitivität und Insulinsekretion [137]. Auch mehrere Jahre vor Krankheitsausbruch konnte kein Defekt der Insulinsekretion festgestellt werden, vielmehr war die Insulinsekretion, bei bereits nachweisbarer Insulinresistenz, erhöht. Somit ist zunächst anders als beim Diabetes mellitus Typ I nicht ein Defekt der Insulinsekretion für die Entstehung des Typ II Diabetes verantwortlich, sondern zunächst eine verminderte Insulinwirkung. Erst im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu einer Abnahme der Insulinsekretion [137]. Die Manifestation des Diabetes mellitus Typ II ist ein schleichender Prozess über viele Jahre. Denn die erhöhte Insulinsekretion hat langfristig gravierende Auswirkungen auf die β Zellen des Pankreas, sodass die Zahl der β Zellen abnimmt und es dadurch neben der Insulinresistenz auch zu einer Abnahme der Insulinmenge kommt mit der Folge einer diabetischen Stoffwechsellage. Als Ursache für die Abnahme der β Zellen werden oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und Belastung des endoplasmatischen Retikulums genannt, was zu Apoptose der β Zellen führen kann [138]. Der relative Insulinmangel zum

Erkrankungsbeginn geht im Verlauf in einen absoluten Insulinmangel über. Durch den langsamen progredienten Verlauf wird die Diagnose oft erst spät gestellt [126]. Aufgrund der Pathogenese besteht also meist für einen längeren Zeitraum eine Hyperglykämie, die dann zu den bereits benannten Komplikationen führt.

Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 können Übergewicht, Alter, Ethnizität, positive Familienanamnese, Lebensstilfaktoren wie verminderte Aktivität, Dyslipoproteinämie, Hypertonie aber auch Umweltfaktoren genannt werden [139],[140],[126]. Die mit Diabetes mellitus assoziierten Komplikationen entstehen schließlich aufgrund einer Hyperglykämie als gemeinsame Endstrecke der Typ I oder Typ II Erkrankung [124],[121].

Zur Therapie gibt es im Gegensatz zum Typ I Diabetes mellitus zahlreiche Optionen. Gemäß der Nationalen Versorgungsleitlinie orientiert sich die Therapie an einem Stufenschema. Auf der ersten Stufe wird eine Lebensstiländerung empfohlen, die körperliche Aktivität, Ernährungsumstellung, Gewichtsreduktion sowie Patientenschulungen beinhalten. Ist nach drei bis sechs Monaten nicht der Ziel HbA1C erreicht worden, wird die Lebensstil-Änderung mit einem oralen Antidiabetikum kombiniert. Medikament der ersten Wahl ist dabei Metformin. Führt auch dies nicht zum Erreichen des Ziel-HbA1C Wertes, so erfolgt eine Kombination aus zwei oralen Antidiabetika. Sollte dies nicht ausreichend sein, kann entweder eine alleinige Insulintherapie oder eine Insulintherapie in Kombination mit Antidiabetika notwendig werden [126].

1.8 Diabetes mellitus und die Muskelfunktion

Abhängig von der Insulinwirkung, kommt es zur Translokation des Glukosetransporters 4 (Glut 4) in die Zellmembran, worüber dann Glukose in die Muskelzelle aufgenommen werden kann. Der Skelettmuskel macht in gesunden Individuen 40%- 60% des Körpergewichts aus und hat dabei einen Anteil von ungefähr 80% an der insulinstimulierten Glukoseaufnahme [141],[142],[143],[86]. Dies macht deutlich, dass der Skelettmuskel eine Schlüsselrolle für die Glukosehomöostase besitzt [2],[129],[144]. Kommt es zu einer Störung der Insulinwirkung, -sekretion oder beidem, resultiert dies in einer verminderten Glukoseaufnahme in die Muskelzellen und folglich einer Hyperglykämie [58],[144],[142].

Die Insulinsensitivität korreliert mit der Dichte der Insulinrezeptoren der Skelettmuskelzelle und auch die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in die Muskulatur nimmt mit steigender Insulinrezeptordichte zu [145]. Die Insulinrezeptordichte ist jedoch nicht in jedem Muskel identisch, sondern variiert, abhängig von der Fasertypzusammensetzung. So findet sich eine hohe Dichte der Insulinrezeptoren im M. soleus mit prädominant langsam zuckenden, oxidativen Muskelfasertypen; eine geringere Dichte der Rezeptoren findet sich in Muskelgruppen mit prädominanten schnelleren und glykolytischen Muskelfasertypen wie dem M. extensor digitorum longus [145],[86],[146]. Neben einer erhöhten Insulinrezeptordichte findet sich auch eine erhöhte Glut 4 Menge sowie eine erhöhte Menge oxidativer Enzyme der Atmungskette in Typ I Muskelfasern verglichen mit den Typ II Fasern [146], was zu einer hohen Insulinsensitivität der oxidativen Muskelfasern führt. Somit führt eine Störung der Insulinwirkung oder eine verminderte Sekretion von Insulin zu einer beeinträchtigten Verwertung des Großteils der im Blut zirkulierenden Glukose im Skelettmuskel.

Weiterhin fassten Klueber et al zusammen, dass der Skelettmuskel Insulin zum Wachsen benötigt, was bei einer Diabetes mellitus Erkrankung zu einem Muskelschwund führen kann [147]. Somit wird deutlich, dass eine diabetische Erkrankung neben schwerwiegenden metabolischen Folgen auch einen großen Einfluss auf die Skelettmuskulatur hat, was auch als diabetische Myopathie bezeichnet wird und im Verlauf näher beschrieben wird.

1.8.1 Diabetische Myopathie

Da der Skelettmuskel der Hauptverbraucher der Blutglukose ist, [58],[148],[149],[144] und insulinvermittelt einen Großteil der Glukose aufnimmt, erscheint es nicht verwunderlich, dass es bei einer verminderten oder fehlenden Insulinwirkung zu einer Beeinträchtigung der Muskelfunktion, einer diabetischen Myopathie, kommen kann. Unter Myopathie versteht man allgemein eine Schwäche der Muskulatur. Die diabetische Myopathie ist jedoch vielmehr charakterisiert durch eine Reduktion der strukturellen, funktionellen und metabolischen Fähigkeiten des diabetischen Skelettmuskels [150].

Die diabetische Myopathie hat eine zentrale Relevanz für den Gesamtorganismus. Das Insulin wird unter physiologischen Bedingungen vom Pankreas pulsatil abgegeben und gelangt so zunächst aufgrund der anatomischen Lage und der Gefäßversorgung in den Pfortader Kreislauf, sodass in der Leber drei bis fünfmal höhere Insulinspiegel als in der Peripherie wirken [151],[152]. Bei Dysfunktion der β Zellen des Pankreas wird die verminderte Insulin Produktion oft durch subkutane Injektionen von Insulin kompensiert. Durch die subkutanen Injektionen ist die Konzentration des Insulins, verglichen mit physiologischen Bedingungen, in der Pfortader geringer. Das periphere Gewebe wie zum Beispiel die Skelettmuskulatur hingegen wird bei subkutanen Insulin Injektionen einer erhöhten Insulin Konzentration ausgesetzt. Dadurch bekommt die Skelettmuskulatur eine größere Bedeutung in der Verstoffwechslung des Blutzuckers sowie der Energiehomöostase [152],[150]. Eine periphere Hyperinsulinämie, wie sie beispielsweise in der frühen Krankheitsentstehung des Diabetes mellitus Typ II vorkommt [137], ist zudem assoziiert mit Hypoglykämie, starken Blutzuckerschwankungen, Insulinresistenz, Gewichtszunahme, arterieller Hypertonie und Schädigung des Gefäßsystems im Sinne einer Atherosklerose [152].

Untersuchungen nach kurzer (17 Monate – 5 Jahre) und langer (7-32 Jahre) Erkrankungsdauer zeigten ultrastrukturelle Veränderungen im Sinne eines Verlustes der Myofilamente, verschobene A- und I-Banden sowie mit zunehmender Dauer in der Langzeit Gruppe auch Veränderungen bedingt durch eine Neuropathie [153],[150]. Als Folge der diabetischen Stoffwechsellage kommt es auch zu einer Muskelatrophie [154],[155],[156],[157]. Eine Erklärung dafür ist zum einen die diabetische Neuropathie [155],[154], aber zum anderen auch ein kataboler Proteinstoffwechsel [158],[157]. Durch die Beeinträchtigung des Proteinmetabolismus kommt es zu einer Abnahme der Muskelmasse und Muskelfunktion, unter anderem durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Karbonylierung sowie gesteigerter Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau [159],[160].

Weiterhin kommt es sowohl bei Typ I als auch bei Typ II Diabetes Mellitus zu einer Abnahme der Muskelkraft, die unabhängig von einer Polyneuropathie auftreten kann, aber durch eine diabetische Polyneuropathie zusätzlich verschlechtert wird [150],[161],[162],[163]. Bereits durch eine kurzandauernde Hyperglykämie kann die isometrische Muskelkraft temporär verringert werden, wohingegen die isotonische Kraft unbeeinträchtigt bleibt [164].

Bezüglich der Muskelermüdung ist die bisherige Forschung widersprüchlich. Auch ohne eine diabetische Polyneuropathie kann eine erhöhte Ermüdung bei Typ I Diabetes Mellitus nachgewiesen werden, die wiederum auch durch eine Polyneuropathie verstärkt werden kann [161]. Andersen beschrieb eine erhöhte Muskelausdauer bei langjährigen Typ I Diabetikern [162].

Eine Diabetes mellitus Erkrankung hat auch einen Einfluss auf die metabolische Funktion des Skelettmuskels. Gesunde Muskeln können entweder Glykogen oder Lipide als Substrat für die Energiegewinnung nutzen, wobei der limitierende Faktor für die Verstoffwechslung von Lipiden das geringe Angebot der freien Fettsäuren im Blut ist [165]. In Bezug auf die metabolische Funktion des diabetischen Skelettmuskels ist die Studienlage noch uneindeutig. Einerseits ist ein Insulinmangel bei

Diabetes mellitus mit einer verminderten mitochondrialen Funktion assoziiert, was zu einer signifikanten Abnahme der maximalen ATP-Produktion in der Muskulatur führt. Wobei die verminderte mitochondriale Funktion auf einer Veränderung der Gentranskription für die oxidative Phosphorylierung beruht [166]. Zudem ergeben sich auch Hinweise auf eine vermehrte Energiegewinnung über den glykolytischen anaeroben Weg bei diabetischer Myopathie, was möglicherweise durch eine verminderte mitochondriale Funktion erklärt werden kann [150],[165],[167]. Andererseits konnten Krause et al. nachweisen, dass in der diabetischen Muskulatur der Streptozotocin (STZ) Mäuse als Modell für Typ I Diabetes ein Wechsel vom glykolytischen hin zum oxidativen Phänotyp stattfindet [168].

Der Einfluss des Diabetes mellitus auf die Muskelfunktion hängt aber auch von der individuellen Fasertypen- Zusammensetzung der Muskelgruppen ab (vgl. Kapitel 1. 5), da schnell zuckende Muskelfasern eher durch Diabetes mellitus beeinträchtigt werden als die langsamen Muskelfasertypen [169]. Dabei konnten Stuart et al. nachweisen, dass der Fasertyp mit der Insulinsensitivität korreliert, wobei sich bei einem Typ II Diabetes als auch beim metabolischen Syndrom mit Insulinresistenz weniger oxidative Typ I Fasern finden [141]. Somit ist die Auswirkung einer Diabetes mellitus Erkrankung auf die Muskelfunktion auch abhängig davon welche Muskelgruppe untersucht wird, was die uneindeutige Studienlage erklären kann.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine Diabetes mellitus Erkrankung die Funktion der Skelettmuskulatur beeinträchtigen kann, denn der Skelettmuskel hat eine zentrale Rolle in der Energiehomöostase.

1.8.2 Insulinresistenz und molekularer Mechanismus der Diabetes Induzierten Veränderungen am Skelettmuskel

Die Insulinresistenz am Skelettmuskel, aber auch an anderem Gewebe, ist ein Hauptmerkmal der Diabetes mellitus Typ II Erkrankung [170],[171]. Patti et al. fassten als mögliche Mediatoren der Insulinresistenz eine veränderte Genexpression, Störung der Insulinsignalwege, eine veränderte Muskelglykogen Synthese sowie eine Akkumulation von intramuskulärem Fett zusammen [171]. Bei Diabetes mellitus Typ II kann ein erhöhter intramuskulärer Lipidgehalt vorkommen und über diesen kann eine Insulinresistenz ausgelöst werden [85],[86],[104]. Auch die Muskelfasertypen können durch eine unterschiedliche Ausstattung an Glut 4 Transportern einen unterschiedlichen Insulinsensitivität aufweisen. So wiesen die Typ I Muskelfasern einen hohen GLUT4 Gehalt und eine hohe Insulinsensitivität auf, die Typ II Muskelfasern jedoch nur eine intermediäre Insulinsensitivität sowie einen geringen GLUT4 Gehalt. Somit kann ein Wechsel der Muskelfasertypen zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen [86]. Über eine durch die Insulinresistenz bedingte Abnahme der insulinsensitiven Typ I Fasern sowie einer Zunahme der weniger insulinsensitiven Typ II Fasern [141] in Kombination mit einer vermehrten Einlagerung von Lipiden bei Diabetes mellitus und lipidreicher Ernährung kommt es zu einem Circulus vitiosus in der Entstehung der Insulinresistenz [86],[85].

An Muskelbiopsien diabetischer Individuen konnte ein moderater (ca. 20%) Abfall der Expression von Genen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, gezeigt werden. Die Veränderungen sind zwar moderat im Vergleich zu Individuen mit einer unveränderten Glucosetoleranz, aber konnten immerhin bei 89% der Genanalysen nachgewiesen werden [170]. Ebenso wurde auch in Individuen mit einer Hyperglykämie bei verringerter Glukosetoleranz eine verringerte Expression, der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Gene nachgewiesen [170]. Zusätzlich gibt es eine Assoziation zwischen Insulinresistenz und verminderter oxidativer Kapazität [172],[170],[171]. Bei der Suche nach der Ursache der verringerten Expression der Gene fiel das Augenmerk auf *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α* (PGC-1 α), der auch an Muskelfaserveränderungen oder der Bildung von Mitochondrien beteiligt ist [170],[171]. PGC-1 α ist außerdem an der Energieversorgung des Skelettmuskels beteiligt und

reguliert den Glukose-, Energie- und Lipidmetabolismus, sodass dem Organismus eine Anpassung an Umweltbedingungen und Ernährungsstatus ermöglicht wird [172]. In weiteren Untersuchungen fanden Mootha et al. eine um ungefähr 20% verringerte Expression des PGC-1 α in Muskelbiopsien von Individuen mit Typ II Diabetes mellitus und Insulinresistenz, was Patti et al bestätigen konnten [171]. Ebenso konnten sie an mehreren Genen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, eine Bindestelle für *Nuclear Respiratory Factor 1* nachweisen. Eben dieser *Nuclear Respiratory Factor 1* ist ein Transkriptionsfaktor, der durch PGC-1 α koaktiviert wird [170]. Durch die verminderte Expression von PGC-1 α im diabetischen Muskel kommt es somit über den *Nuclear Respiratory Factor 1* zu einer Abnahme der oxidativen Kapazität, sodass eine Korrelation zwischen der verringerten PGC-1 α Expression und der konsekutiv verringerten Expression, der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Gene hergestellt werden kann [170],[171]. Die Erkenntnis, dass PGC-1 α durch Training und körperliche Bewegung induziert und vermehrt exprimiert wird, zeigt die wichtige Rolle von PGC-1 α im Energiemetabolismus des Skelettmuskels. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Insulin im Skelettmuskel aber auch eine Glucose Aufnahme in die Muskelzelle zu einer vermehrten Expression von PGC-1 α im Skelettmuskel führen kann. Zusätzlich spielen aber auch viele weitere Faktoren eine entscheidende Rolle in der Regulation von PGC-1 α [173],[174]. Dabei führt PGC1 α neben der Mitochondrien Genese und Aktivierung der Substratoxidation zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Myocyte enhancer factor 2* zu einer vermehrten Expression von Proteinen, die vor allem in Typ I Muskelfasern exprimiert werden, was sowohl fibrilläre als auch kontraktile Proteine der Muskelfaser vom Typ I einschließt [174] .

Dadurch kann PGC-1 α über den Transkriptionsfaktor *Myocyte enhancer factor 2* zu einer vermehrten Expression von Proteinen der Typ I Muskelfasern führen und ein Wechsel der Muskelfasertypen hin zu oxidativen Typ I Fasertypen bewirken.

Auch eine HFD induziert über eine chronische Inflammation und die Akkumulation von intramuskulären Fett eine Insulinresistenz [82],[175]. Bereits nach drei Tagen HFD kommt es zu einer verminderten Insulinsensitivität und ebenso zu einem Anstieg des intramuskulären Lipidgehalts im M. soleus; somit besteht eine negative Korrelation zwischen der Menge des intramuskulären Lipids und der Insulinsensitivität [176]. HFD führt aber auch zu einer Erhöhung der Enzymmenge für die Fettsäure Verstoffwechslung und Oxidation. Einige Enzyme der Atmungskette des Citratzyklus sowie Enzyme für den Fettsäuretransport in die Mitochondrien sind ebenfalls erhöht. Die Fettsäuren regulieren die Genexpression durch direkte Interaktion mit *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR), wodurch es zur Hochregulation der Transkription von Genen für die Fettsäureoxidation sowie der Mitochondrien Anzahl kommt. Durch eine HFD kann somit eine erhöhte oxidative Kapazität im Skelettmuskel induziert werden [177]. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass es unter einer HFD bevorzugt zur Verwertung von Fettsäuren zu Ungunsten der Glukoseverstoffwechslung bei Insulinresistenz kommt [175].

1.8.3 Die Rolle der *Lipid Droplets* in der diabetischen Muskulatur

Die Akkumulation von LD in der Skelettmuskulatur ist mit einer Insulinresistenz assoziiert [85],[102] und es besteht eine inverse Korrelation zwischen Lipidgehalt und Insulinsensitivität [103]. Dabei spielen PLIN und die LD eine Schlüsselrolle in der Regulation des Fettsäuremetabolismus und der Entwicklung einer Insulinresistenz [178],[118].

Der postulierte Mechanismus hinter der Zunahme der Insulinresistenz bei Akkumulation von LDs ist eine Translokation von SNAP23 von der Plasmamembran auf den Monolayer aus Phospholipiden der LD. Denn SNAP23 ist sowohl für die insulinstimulierte Integration von Glut4 in die Plasmamembran als auch für die Fusion von LD bei der Synthese der Lipidspeicher, beispielsweise nach lipidreicher Diät, verantwortlich; sodass es bei vermehrter Aufnahme von Lipiden zu einer Translokation von SNAP23 von

der Plasmamembran in Richtung LD kommt. Dadurch können dann Glut4 haltige Vesikel nur noch vermindert mit der Plasmamembran fusionieren, was darüber die Insulinresistenz verstärkt [179],[180]. Es besteht somit eine Verbindung zwischen fettreicher Ernährung und Zunahme der LD sowie einer dadurch bedingten Insulinresistenz.

Umek et al. haben beschrieben, dass Übergewicht zu einer Zunahme von intramuskulärem Fett führen kann [86] aber auch Diabetes Mellitus Typ II und die einhergehende Insulinresistenz können zu einer Zunahme der LD beziehungsweise der intramuskulären Lipide in der Muskulatur führen [104],[84]. Weiterhin können akkumulierende LD die Sarkomere verändern und zu einer veränderten Expression von Myosin Schwere Ketten Isoformen führen [86].

Auch die Lipide DAG und Ceramide können eine Lipotoxizität verursachen und darüber für die Insulinresistenz verantwortlich gemacht werden [113],[86],[84]. Dennoch haben die LD durch die Speicherung der Lipide eine Schlüsselrolle für die Insulinsensitivität [178]. So haben größere Lipide eine nachteiligere Auswirkung auf die Insulinsensitivität als kleinere [111]. In Typ II Diabetes mellitus speichern die Patienten eine höhere Anzahl von stark vergrößerten LD in der Skelettmuskulatur, vor allem in subsarkolemmaler Lokalisation [104]. Übergewicht und Diabetes mellitus Typ II können zwar beide die LD vergrößern, aber nur bei Diabetes mellitus Typ II finden sich deutlich größere LD [181],[111]. Auf der Oberfläche der sehr großen LD findet sich zudem deutlich mehr PLIN2 und konsekutiv weniger ATGL [115]. Das hat eine Auswirkung auf die oxidative Kapazität, da eine Überexpression von PLIN2 zu einer Reduktion der oxidativen Enzymausstattung führt, unter anderem über die Reduktion von PGC-1 α [118].

1.8.4 Das verwendete Mausmodell für Diabetes mellitus

Die Erzeugung eines Tiermodells für Diabetes mellitus erfolgte in dieser Arbeit mittels STZ- Injektionen. STZ ist ein Antibiotikum, das eine Zerstörung der pankreatischen β Zellen auslöst und damit Bedingungen ähnlich einem Typ I Diabetes mellitus auslöst [182]. Durch die STZ- Injektionen konnten daher im Tiermodell Eigenschaften erzeugt werden, die Diabetes mellitus Typ I erkrankten Menschen ähneln [183],[182]. Es wurde dabei die zytotoxische Wirkung von STZ auf die β Zellen des Pankreas, in denen STZ akkumuliert, ausgenutzt [183]. Zum Verständnis der zytotoxischen Wirkung von STZ ist es relevant, dass die β Zellen im Pankreas einen Glukosetransporter (GLUT2) besitzen, der niedrig affin für Glukose ist, und über den STZ in die β Zellen gelangt [183]. Da STZ ein Strukturanalogon zu Glukose darstellt, kann dieses über den Glut2 Transporter in die pankreatischen β Zellen aufgenommen werden [183],[184], wo STZ durch eine Nitrosearnstoff- Gruppe eine DNA Fragmentierung auslöst und in der Regel den Zelltod auslöst [185],[186]. Zudem kann STZ über DNA Methylierung, Stickstoffmonoxid Produktion und Erzeugung von freien Radikalen wie Wasserstoffperoxid den β - Zelltod bewirken [185],[183],[186]. Zur Induktion eines Typ II Diabetes mellitus werden niedrigere Dosen STZ in Kombination mit einer *high fat diet* (HFD) genutzt [186],[182]. Eine Gruppe der Versuchstiere erhielt neben der STZ- Injektion anstatt Standardfutter eine *high fat/ high sucrose* Diät. Über diese HFD wurde eine chronische Inflammation und die Akkumulation von intramuskulärem Fett ausgelöst, die zusätzlich eine Insulinresistenz induzierten [82]. In einer Arbeit von Eshima et al konnte gezeigt werden, dass die HFD zu einer größeren Glukoseintoleranz sowie einer signifikant reduzierten Insulinsensitivität führt [82], sodass die Tiergruppe mit HFD und STZ Behandlung Bedingungen ähnlich zu dem Diabetes mellitus Typ II aufweist.

Die Fütterung mit Fettfutter im Rahmen einer HFD kann bereits allein zu höheren Blutglukose Werten im Vergleich zur Fütterung mit Standardfutter führen, jedoch können die Blutzuckerwerte nach Beginn der STZ Injektionen auf mehr als 200% gesteigert werden [187]. Durch den *high fat* Anteil im Tierfutter werden zudem hohe Blutfettwerte erzeugt [187]. So beschreiben Magalhães et al deutlich höhere Triglyzerid Werte im Blut der Tiere bei Fütterung mit dem *high fat* Futter in Kombination mit einer STZ-

Gabe im Vergleich zur Fütterung ohne *high fat* Futter und ohne STZ-Injektion. Weiterhin sind um bis zu 90% höhere VLDL Cholesterin Werte beschrieben worden [187].

1.9 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit hat zum Ziel, die Auswirkung der LD sowie einer möglichen Titin Modifikation auf die Muskelfunktion am präparierten, intakten Skelettmuskel zu untersuchen. Dabei wurde hier das DIOSTZ-beziehungsweise das STZ- Modell genutzt, da diese in besonderer Weise geeignet sind, in vivo LD in der Muskulatur zu erzeugen und im Anschluss daran zu untersuchen [187],[147],[186],[182]. Durch den Vergleich dieser Modelle sollten Einblicke in das Ermüdungsverhalten, die Muskelkraft und die Muskelfasertypenverteilung der diabetischen Skelettmuskulatur gewonnen werden. Der M. soleus wurde ausgewählt, da dieser vor allem aus Typ I und Typ IIA Muskelfasern besteht und diese unter HFD und/oder STZ-Behandlung mit einer vermehrten intramuskulären Lipidakkumulation assoziiert sind [86],[188],[66],[59],[58],[129].

Es soll die Hypothese untersucht werden, dass eine Akkumulation der LD das mechanische Gleiten von Aktin und Myosin behindern und damit die Muskelkraft beeinträchtigen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die *in vitro* Messung der Kontraktilität sowie der Muskelfunktion wurde in dieser Arbeit anhand eines Mausmodells durchgeführt. Dazu wurden ausschließlich männliche Wildtypen des Stammes C57BL/6J genutzt, die in der achten Lebenswoche von Janvier Labs bezogen wurden, bevor sie in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität verschiedenen Behandlungsprotokollen zugeführt worden sind. Für alle Tiere herrschten identische Haltungsbedingungen. Der Exitus letalis der Tiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation nach vorheriger Isofluran Narkose durch dafür qualifizierte und geschulte Mitarbeiter der AG Gödecke. Neben den Hinterbeinen zur Entnahme des M. soleus wurden zusätzlich Pankreas, Leber, Herz sowie Blut zur Analyse entnommen.

Die Behandlung der Tiere gemäß definierter Protokolle, die im Folgenden näher erläutert werden, wurde durch erfahrene und geschulte Forschende der AG Gödecke durchgeführt. Die dem Exitus letalis vorausgehende Isofluran Narkose sowie die Tierversuche (zum Beispiel Herzkatheter- Untersuchungen) wurden ebenso durch erfahrene Postdoktoranden der AG Gödecke durchgeführt. Für sämtliche Tierversuche lag eine entsprechende Genehmigung mit dem Aktenzeichen 81-02.04.2020.A171 sowie 2024-276-Grundantrag vor.

Bei der Behandlung der Versuchstiere und der Einteilung in Versuchsgruppen war es weniger relevant, ob ein Typ I oder Typ II Diabetes mellitus induziert wird, vielmehr ging es darum, ein Mausmodell mit hohen Blutglukose- Werten zu schaffen. Zusätzlich zum diabetischen Mausmodell, das mittels STZ induziert wurde, konnten die Versuchstiere durch unterschiedliche Fütterungsprotokolle in insgesamt drei Versuchsgruppen unterteilt werden, die folgend beschrieben werden.

1. Kontrollgruppe: Diese Tierversuchsgruppe, bestehend aus acht Versuchstieren (n=8), bekam Standardfutter und darüber hinaus keine weitere Behandlung, weshalb diese Versuchsgruppe als Referenzgruppe diente. Die Haltungsbedingungen waren identisch verglichen mit der STZ- und DIOSTZ- Versuchsgruppe.

2. Streptozotocin (STZ) Versuchsgruppe: Neben der Fütterung mit Standardfutter für den gesamten Lebenszeitraum wurde den Tieren (n=8) dieser Versuchsgruppe in der 14. Lebenswoche an fünf aufeinanderfolgenden Tagen die Substanz STZ (50mg/kg Körpergewicht) interperitoneal injiziert. Dabei werden pathophysiologische Zustände vergleichbar mit einem Typ I Diabetes Mellitus erzeugt [182].

Das Standardfutter bestand zu 61% aus Kohlenhydraten, zu 24% aus Protein, zu 6% aus *Sucrose* und nur zu 9% aus Fett. Durch das dargestellte Behandlungsprotokoll wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich höhere Blutzuckerwerte induziert bei einem im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen niedrigeren Mausgewicht. Auch im Vergleich zu den Versuchstieren aus der DIOSTZ- Gruppe (siehe unten), die zuvor mit *high fat/high sucrose* Futter gefüttert wurden, lagen die erreichten Blutzuckerwerte auf einem höheren Niveau, sodass diese Mausgruppe die höchsten Blutzuckerwerte aller Versuchsgruppen aufwies. Das Gesamtgewicht der STZ- Versuchstiere wird aufgrund der Behandlung sowie der Fütterung mit Standardfutter geringer erwartet im Vergleich zur DIOSTZ- und Kontrollgruppe. Zusammenfassend bekamen die STZ-Versuchstiere eine Dosis von 250mg/kg Körpergewicht STZ injiziert, jedoch kein *high fat/high sucrose* - Futter. Da die Haltungsbedingungen aller Versuchstiere identisch waren, bestand der Unterschied zwischen der DIOSTZ- und der STZ- Versuchsgruppe lediglich im Fütterungsprotokoll.

3. DIOSTZ- Versuchsgruppe: Analog zur STZ-Versuchsgruppe wurde auch den Tieren (n=4) dieser Versuchsgruppe in der 14. Lebenswoche an fünf aufeinanderfolgenden Tagen STZ (50mg/kg Körpergewicht) injiziert. Zusätzlich bekamen diese Tiere für 12 Wochen mit Beginn in der 9. Lebenswoche anstatt dem Standardfutter ein *high fat/high sucrose* (DIO) Futter. Daraus ergaben sich als Charakteristika dieser Tiergruppe erhöhte Blutzuckerwerte mit einem im Vergleich zur STZ-Versuchsgruppe erhöhtem Mausgewicht. Durch die Fettfütterung waren zudem erhöhte Blutfettwerte erwartbar. Die Kombination aus Fettfutter und STZ- Behandlung erzeugt pathophysiologische Zustände, die einem Diabetes Mellitus Typ II ähneln [182].

Die Versuchstiere der DIOSTZ- Versuchsgruppe bekamen mit Beginn der neunten Lebenswoche für insgesamt zwölf Wochen ein *high fat/high sucrose* (DIO) Futter ad libitum. Dabei handelt es sich um diabetogenes Futter nach Bioserv F1850 (S7200-E010) mit einem Anteil von 24% Sucrose und 36% Rohfett der Firma SNIFF. Durch die kumulierte Dosis von 250mg/ kg Körpergewicht STZ (DIOSTZ Gruppe) in der fünften Woche der Dio Fütterung wurden die β Zellen des Pankreas geschädigt und damit Diabetes mellitus ähnliche Zustände im Mausmodell geschaffen, die mit hohen Blutglukose Werten einhergehen. Durch Kombination mit der DIO-Fütterung entstand ein Modell mit erhöhten Blutglukose und Blutfettwerten. Obwohl durch die Fütterung mit dem *high fat/high sucrose* Futter der DIOSTZ-Versuchstiere ein erhöhtes Mausgewicht zu erwarten gewesen wäre, führt die Behandlung mit STZ über eine Zerstörung der β Zellen zu einer verminderten Insulin Produktion und folglich zu einer verminderten Insulin Wirkung, die nachweislich auch in den hier genutzten Versuchstieren im Vergleich zu Tieren aus der Kontrollgruppe eine geringere Gewichtszunahme verursachten. Diese ist auf eine gesteigerte Proteo- und Lipolyse aufgrund der reduzierten Insulinwirkung zurückführen [187].

Die Haltungsbedingungen waren in allen drei Behandlungsgruppen identisch, wodurch die Unterschiede der jeweiligen Versuchsgruppe in Fütterungsprotokoll und STZ- Injektionen bestand. Je Versuchsgruppe wurden jeweils an mindestens vier Tieren die Muskelfunktion analysiert. Die Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Analyse 20 Wochen alt.

Zusätzlich zu den 20 Wochen alten Tieren aus den bisher beschriebenen Versuchsgruppen, wurden weitere Tiere (C57BL/6J von Janvier Labs) mit identischer Behandlung (DIOSTZ-, STZ- Kontrollgruppe) untersucht. Diese Tiere bekamen im Vorfeld jedoch zusätzlich eine Herzkatheter Messung und ebenso eine Isofluran Narkose. Der Exitus letalis erfolgte auch hier durch zervikale Dislokation in der 20. Lebenswoche. Die Fütterung der Tiere mit dem *high fat/high sucrose* Futter sowie die STZ-Injektionen begannen analog zu den oben beschriebenen Behandlungsprotokollen.

Aus Kapazitätsgründen konnten nicht alle acht Versuchstiere aus der Versuchstiergruppe ohne Herzkatheter gemessen werden, da im Myographen lediglich vier Messkammern zur Verfügung standen und die Dauer der Ischämie bis zur Muskelmessung ein relevanter Faktor für die gemessene Muskelkraft ist. Daher konnten von den acht möglichen Tieren je Versuchsgruppe lediglich vier Versuchstiere gemessen werden, sodass die Anzahl der ausgewerteten Tiere mit den Versuchstieren, die zuvor einen Herzkatheter erhielten, erhöht wurde.

Zur Erhöhung der Anzahl (n) der untersuchten DIOSTZ- Tiere in der immunhistologischen und biochemischen Untersuchung wurden die 20 Wochen alten Tiere durch eine 26 Wochen alte Tiergruppe ergänzt. Die Fütterung dieser Versuchstiere mit dem *high fat/ high sucrose* Futter begann in der neunten Woche und die STZ- Behandlung erfolgte analog zu den anderen Versuchsgruppen in der 14. Lebenswoche mit 50mg/kg Körpergewicht an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Der Exitus letalis erfolgte mit 26 Wochen. Die immunhistochemischen und biochemischen Untersuchung der drei 26 Wochen alten DIOSTZ Mäusen wurden freundlicherweise von Sabine Bongardt durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die resultierenden Daten wurden anschließend analog zu den Tieren aus der 20 Wochen alten Kohorte ausgewertet.

2.1.2 Chemikalien

Aqua dest.	Eigene Herstellung
Acrylamid/Bisacrylamid 30 /37,5:1	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Biorad
Agarose LE	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Wacker
Bidestilliertes Wasser	Eigene Herstellung
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific
Bradford Solution	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
ECL Ultra Western HRP Substrate HRP Solution A	Merck
ECL Ultra Western HRP Substrate HRP Solution B	Merck
Elastosil RT 625 A	Wacker
Elastosil RT 625 B	Wacker
Essigsäure	Roth
Ethanol 70% vollvergällt	<i>Otto Fischar GmbH & Co. KG</i>
Ethanol 96% vollvergällt	<i>Otto Fischar GmbH & Co. KG</i>
Flüssiger Stickstoff	Linde
Fluoromount-G	Southern Biotech (0100-20)
Glucose	Merck
Guanidinhydrochlorid	AppliChem
Glycin	Roth
Glycerol	Sigma
Harnstoff	Merck
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl) - 1-piperazinyl) - ethansulfonsäure)	Roth
Igepal	Sigma
<i>Imperial protein stain</i>	Thermo Scientific
Isofluran	Pirimal Healthcare
Isopropanol	<i>Otto Fischar GmbH & Co. KG</i>
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma
Methanol	Roth
2-Mercaptoethanol	Sigma
2-Methylbutan (=Isopentan)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃ -)	Merck
Normal Goat Serum	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Pyruvat	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
<i>Optimum Cutting Temperature compound</i>	CellPath
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
Salzsäure (HCL)	Roth

Saponin	Sigma
Sauerstoff zum Begasen der Muskulatur	Linde
Serva Blue R	Serva
SDS Page Ruler + Prestained Protein Ladder	Thermo Scienfitic
Streptozotocin	AdipoGen Life Science
Tetramethylethylendiamin (Temed)	AppliChem
Thioharnstoff	Sigma
Tricin	Roth
Triton X-100	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Tween 20	Sigma

Tabelle 2 Chemikalien und Reagenzien

2.1.3 Puffer- und Lösungen

Puffersystem/Lösung	Zusammensetzung
Aufzeichnungslösung Muskelmessung	137 mM Natriumchlorid 5 mM Kaliumchlorid 1,1 mM Kaliumdihydrogenphosphat 10 mM Natriumhydrogencarbonat 0,8 mM Magnesiumsulfat 10 mM Glucose 10 mM HEPES 1 mM Pyruvat Als Zugabe frisch: 1,8 mM Calciumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid Begasen mit Sauerstoff und CO ₂ pH 7,35-7,45
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1% SDS
10x <i>Tris buffered Saline</i> (TBS) (pH 7,4)	0,2 M Tris 1,5 M NaCl
10x <i>Tris buffered Saline</i> + Tween (TBST) (pH 7,4)	0,2 M Tris 1,5 M NaCl 0,1 % Tween
4xSDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris 0,4% SDS
4x SDS-Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris 0,4% SDS
Anodenpuffer (pH 8,8)	300 mM Tris 100 mM Tricin
Blockierungslösung	2% BSA in 1x TBST
Kathodenpuffer (pH 8,7)	300 mM Aminocaprinsäure 30 mM Tris
<i>Phosphat buffered saline</i> (PBS)	2,7 mM KCL 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat 140 mM Natriumchlorid 10 mM Natriumdihydrogenphosphat ph- Wert 7,5

PVDF <i>destain</i>	10% Essigsäure 40% Ethanol 50% bidestilliertes Wasser
PVDF <i>stain</i>	0,075% <i>Serva blue</i> in Methanol
Strippingpuffer (pH 7,5)	6 M Guanidinhydrochlorid 20 mM Tris 0,2% Igepal
Titin-Probenpuffer (SDS-Probenpuffer) (pH 6,8) (auch modifizierter Laemmli Puffer)	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 3 % SDS 0,035 Serva Blue 10 % Glycerol 0,05 M Tris

Tabelle 3 Puffer und Lösungen

Aufzeichnungslösung

Zur Messung der Muskelfunktion sowie zur Präparation der Muskulatur wurde eine spezielle Aufzeichnungslösung verwendet. Die Messkammer des DMT 840 Myograph wurde vor Einspannen der Muskelpräparate mit der Aufzeichnungslösung befüllt. Die Aufzeichnungslösung diente vor allem dem Zweck, physiologische Bedingungen im Hinblick auf osmotisches Gleichgewicht und Ionenhomöostase zu schaffen und dadurch die Stabilität der Muskulatur während der Muskelmessung zu gewährleisten. [189]

Die Lösung zur Aufzeichnung der Muskelkraft wurde wie folgt hergestellt:

137 mM Natriumchlorid
5 mM Kaliumchlorid
1,1 mM Kaliumdihydrogenphosphat
10 mM Natriumhydrogencarbonat
0,8 mM Magnesiumsulfat
10 mM Glucose
10 mM HEPES
1 mM Pyruvat
Als Zugabe frisch:
1,8 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid
Begasen mit Sauerstoff und CO₂
pH 7,35-7,45

Die Aufzeichnungslösung wurde in der Messkammer auf 25°C gebracht und kontinuierlich mit Sauerstoff begast. Der pH-Wert wurde auf einen Zielbereich von 7,35-7,45 eingestellt.

2.1.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 4, 5 und 6 aufgelistet. Besonders erwähnenswert sind die Titin- Antikörper, die eigens für die Verwendung in der AG Krüger von der Firma *ImmunoGlobe* GmbH hergestellt worden sind.

Zur Erzeugung der Antikörper gegen die PEVK-Region des Titins sowie phosphorylierungsspezifische Epitope der PEVK-Region wurden Kaninchen genutzt. Für das phosphorylierte Epitop des Serins an

Position 11878 wurde das Kaninchen mit der Sequenz CEVVLK [pS] VLRKR immunisiert. Weiterhin folgten innerhalb von 14 Wochen zweimalig ein *Booster* und die Affinitätsreifung der Antikörper über 20 Wochen im selben Kaninchen, wodurch ein phosphorylierungsspezifischer Antikörper gegen das Serin an Position 11878 (pS11878) erzeugt werden konnte. Es folgte eine affinitätschromatografische Aufreinigung der Antikörper aus dem Serum des Kaninchens. Zudem fiel als ein Nebenprodukt der Affinitätsreinigung des phosphospezifischen Antikörpers gegen das Epitop pS11878 ein Antikörper an, der gegen die unphosphorylierte PEVK-Region des Titins gerichtet ist, im weiteren als PEVK Pan Antikörper bezeichnet. Der PEVK Pan Antikörper diente zum einen als Beladungskontrolle und zum anderen als Referenzbande für die später beschriebene Phosphorylierungsanalyse. Die genannten Gensequenzen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz des humanen Titingens (*UniProtKB accession number* Q8WZ42).

Eine weitere Besonderheit der verwendeten Antikörper stellen die primären Antikörper zur Differenzierung der Muskelfasertypen an histologischen Schnitten in der Immunhistochemie (IHC) dar. Diese wurden aus Hybridoma Zelllinien gewonnen und freundlicherweise von Prof. Axel Gödecke (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Eine Hybridoma Zelle entsteht durch die Fusion einer immortalisierten Krebszelle mit einer Antikörper produzierenden Zelle. Diese Hybridoma Zellen stammen aus Mäusen, die mit gereinigtem bovinem Myosin immunisiert wurden. Die durch die Hybridoma Zellen produzierten Antikörper wurden schließlich aus dem Überstand der Zellkultur gewonnen.

Primäre Protein-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Anti PKC α phospho T 497	1:10000	Kaninchen	Abcam
Anti PKC α total	1:10000	Kaninchen	Abcam
<i>Murine monoclonal IgG2b antibody - reacts with rat type I (slow-twitch oxidative) fibers</i>	1:10	Maus	<i>produced using the hybridoma cell line BA-F8 purchased from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH</i>
<i>Murine monoclonal antibody (IgG1) - reacts with rat type IIa (fast-twitch oxidative) fibers</i>	1:25 (IHC)	Maus	<i>produced using the hybridoma cell line SC-71 purchased from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH</i>
<i>Murine monoclonal antibody (IgM) – reacts with rat type IIb (fast-twitch glycolytic) fibers</i>	1:50 (IHC)	Maus	<i>produced using the hybridoma cell line BF-F3 purchased from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH</i>
Perilipin 2	1:1000	Kaninchen	Abcam
Perilipin 2	1:100 (IHC)	Guinea Pig	Progen
Perilipin 5	1:10000	Kaninchen	Proteintech
Perilipin 5	1:100 (IHC)	Guinea Pig	Progen
α - Aktinin	1:5000	Kaninchen	Cell Signaling

Tabelle 4: verwendete primäre Antikörper

Sekundäre Protein Antikörper

<i>Anti Rabbit horseradish peroxidase conjugated</i>	1:5000	Ziege	<i>Cell Signaling</i>
<i>Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ subclass 2b specific (590nm)</i>	1:50 (IHC)	Ziege	<i>Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. #115-295-207</i>
<i>AMCA AffiniPure Goat Anti-Mouse IgM, μ chain specific (450nm)</i>	1:100 (IHC)	Ziege	<i>Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. #115-155-075</i>
<i>Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ subclass 1 specific (520nm)</i>	1:100 (IHC)	Ziege	<i>Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. #115-095-205</i>
<i>Goat Anti Guinea- Pig Cy3 (570nm)</i>	1:300 (IHC)	Ziege	<i>Dianova</i>

Tabelle 5 verwendete Sekundärantikörper

Titin-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Anti pPEVK S11878 phospho	1:1000	Kaninchen	<i>ImmunGlobe GmbH</i>
Anti PEVK Pan	1:2000	Kaninchen	<i>ImmunGlobe GmbH</i>
<i>Anti Rabbit horseradish peroxidase conjugated (Sekundärantikörper)</i>	1:3000	Ziege	<i>Cell Signaling</i>

Tabelle 6: verwendete Titin Antikörper

2.1.5 Geräte, Instrumente und *Software*

Laborgerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Bildschirm	V243	HP
Blottingapparatur	Trans Blot Turbo Transfer	Biorad
Chemolumineszenz <i>Imager</i>	Fusion FX Edge VO.7	Vilber and Lourmat
Cryostat microtome Rotation	CM1860	Leica Biosystems
Digitaler Messschieber	Art. Nr.: 20497503	Alpha Tools
Eismaschine	R404 A	Ziegra
Elektrophorese-Kammer	Mini-Protean Tetra	Biorad
Feinwaage	ADB 200-4	Kern& Sohn
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000C	Keyence
Gefrierschrank -20°C	Typ 311104	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	UXF40086V	Thermo Scientific
Kanülen Sterican	Ø 0,8 x 12mm, stumpf	Braun
Kanülen Sterican	Ø 0,45 x 12mm	Braun
Kühlschrank	KT1730	Liebherr
Lichtmikroskop Binokular	S8AP10	Leica
Magnetrührer	Basic RCTB	IKA
Mikrowelle	EMWD 2818	Bauknecht
Muskelstimulator	Stimulator CS4+	Danish Myo Technologie
MyoDYNAMIC Muscle Strip System	840MD	Danish Myo Technologie
Nonabsorbable Braided Silk Suture 5.0	(Item No.: 18020-30)	FST (Item No.: 18020-30)
Orbitalschüttler	Shaker Dos	NeoLab
PapPen	Liquid Blocker	Daido Sangyo Co
PC	Elite Desk 800 G2TWR	HP
pH- Meter	MP220	Mettler Toledo
Photometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech
PowerLab data acquisition system		Danish Myo Technologie
Power Pack	Standard P25 T	Biometra
Präparierbesteck		FST
Präparierleuchte	KL1600 LED	Schott
PVDF-Membranen	-	Roth
Vakuum Pumpe (Myograph)		Danish Myo Technologie
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Taumel-Rollmischer	RM5-30V	CAT
Tischzentrifuge	MiniStar blueline	VWR
Waage	Kern 572	Kern& Sohn
Wasseraufbereitung	Milli Q	Merck
Wasserbad	Julabo 20B	Julabo
Whatman Papier		Whatman international Ltd.

Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Verwendete Software

Software	Hersteller
Citavi	<i>Swiss Academic Software GmbH</i>
DMT 840 MD Controller Software 1, v1.3.0	Firma <i>Danish Myo Technologie</i>
Evolution Capt Edge V. 18.02	Vilber
<i>GraphPad Prism Version 8.2.0 –</i>	<i>Graph Pad Software Inc</i>
ImageJ	<i>National Institutes of Health</i>
LabChart v.8.1.24 25/10/2022	Firma ADInstruments
<i>MyoPulse Software Version 2.3.1.0</i>	Firma <i>Danish Myo Technologie</i>
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Microsoft Power Point	Microsoft Corporation
Microsoft Word	Microsoft Corporation

Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Software

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Isolation der Muskulatur am Mausmodell

Zur Fixierung der entnommenen Skelettmuskulatur wurden Elastosil Petrischalen benötigt, in denen mittels Insektennadel das entnommene Muskelpräparat aufgespannt wurde, sodass es anschließend mit Nähten für die Kraftmessung vorbereitet werden konnte. Die Elastosil Petrischalen wurden im Labor nach etabliertem Standard hergestellt und gegossen. Dazu wurde Elastosil A (60g) und Elastosil B (6,67g) im Verhältnis 9:1 gemischt. Die Mischung wurde im Anschluss gleichmäßig auf die Petrischalen verteilt und die Aushärtung abgewartet.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der *Musculus (M.) soleus* genutzt. Der Exitus letalis der Tiere erfolgte vor Beginn der Präparation durch cervikale Dislokation.

Zur Präparation der Muskulatur wurde eine Petrischale mit 4°C kalter mit Sauerstoff begaster Aufzeichnungslösung befüllt. Im Anschluss erfolgte die Präparation der Muskulatur in der kalten Aufzeichnungslösung unter kontinuierlich Begasung mit Sauerstoff. Dadurch wurde ein Austrocknen der Muskelpräparate während der Präparation verhindert und eine Versorgung mit wichtigen Substraten erleichtert. Nach der vollendeten Präparation wurden die Elastosil Schalen mit den Muskelpräparaten umgehend auf Eis gekühlt, bis diese in den Myograph eingespannt wurden beziehungsweise unmittelbar im Anschluss in den Myographen eingespannt.

Vor der Isolierung und Entnahme der Muskulatur wurde das Fell des getöteten Tieres mit Ethanol befeuchtet. Bei der gesamten Präparation wurde darauf geachtet, die zu verwendende Muskulatur zu schonen, insbesondere wurde die Muskulatur nicht gequetscht, überdehnt oder fälschlicherweise inzidiert, damit die *in vitro* Muskelfunktionsmessung aussagekräftige Resultate liefern konnte. Bereits kleine Schäden der Muskelfaser Integrität während der Präparation beeinträchtigen die Fähigkeit der Kraftproduktion [189].

Zudem wurde, nach Maßgabe des Manuals des DMT 840 Myograph [189], der gesamte Muskel mit intakten Sehnen am proximalen und distalen Ende entnommen.

Für die späteren Messergebnisse war es von großer Bedeutung die Präparation der Muskulatur zügig durchzuführen, sodass die Ischämie Zeit der Muskulatur bis zum Beginn der Muskelmessung möglichst minimiert wurde. In Abbildung 9 ist der vorbereitete Präparationsplatz mit allen notwendigen Materialien dargestellt.



Abb. 9 vorbereiteter Präparationsplatz

Präparation des Musculus soleus

Zur Präparation des Musculus soleus wurde zunächst der Hinterlauf der Maus mit einer Kanüle fixiert sowie das Fell mit Ethanol benetzt. Im Anschluss daran wurden das Fell und die Haut der Maus mit einer scharfen chirurgischen Mikroschere inzidiert und stumpf ab präpariert. Im Folgenden wurde das Bein des Versuchstieres oberhalb des Knies scharf abgesetzt. Die weitere Dissektion des M. soleus erfolgte mit feiner Pinzette und scharfer chirurgischer Mikroschere unter einem binokularen Mikroskop sowie einer Vergrößerungslupe. Die Präparation fand unter kontinuierlicher Begasung der Lösung mit Sauerstoff in der Elastosil Schale statt. Es wurde damit begonnen, die sichtbaren Faszien zu inzidieren und möglichst schonend zu entfernen, sodass damit die Versorgung des Muskels über Diffusion im Organbad erleichtert wurde. Zunächst wurde der freiliegende M. triceps surae, bestehend aus dem medialen und lateralen Kopf des M. gastrocnemius sowie dem M. soleus, stumpf und schonend präpariert. Im Anschluss wurde die Achillessehne und deren Ansatz am Os calcaneus aufgesucht und weit distal durchtrennt, um die Länge der Sehnen zu maximieren. Die Achillessehne besteht aus den Sehnen des M. gastrocnemius und des M. soleus, sodass nach stumpfer Präparation und Durchtrennung der Achillessehne der M. triceps surae unter Durchtrennung der medialen und lateralen Faszien nach proximal umgeklappt werden konnte. Sobald der M. gastrocnemius nach proximal umgeschlagen worden ist, wurde auf der Innenseite der deutlich rot erscheinende M. soleus sichtbar, dessen proximale Tendon an der dorsalen Tibia in der Nähe des Knies der Maus aufgesucht wurde und anschließend möglichst proximal durchtrennt wurde, um ebenso die Länge der proximalen Tendon des Muskels zu maximieren. Vor der Durchtrennung der proximalen Sehne wurde jedoch möglichst am myotendinösen Übergang mittels eines nicht absorbierbaren geflochtenen Seidenfaden der Stärke 3,0 durch ein Instrumentenknoten sowie vier Einzelkopfknoten eine Naht gesetzt.

Die freien Fadenenden der Naht am proximalen myotendinösen Übergang wurde im weiteren Verlauf dazu genutzt das Muskelpräparat in der Messkammer des Myographen zu fixieren.

Nachdem die proximale Tendon des Muskels durchtrennt wurde, ließ sich anschließend die distale Tendon des M. soleus schonend aus der Achillessehne lösen.

Nachdem der Muskel vollständig präpariert und entnommen worden ist, wurde dieser unter leichter Dehnung in eine Elastosil Petrischale mit gekühlter 4°C kalter Aufzeichnungslösung abgelegt und somit die Versorgung des Muskelpräparates über Diffusion ermöglicht. Die weitere Vorbereitung des Präparates fand in der mit Sauerstoff begasten und gekühlten Aufzeichnungslösung statt.

Die Sehnen des entnommenen Muskels wurden mit Insektennadeln im Boden der Elastosil Petrischale fixiert. Anschließend wurde auch an dem distalen Tendon des M. soleus nah am myotendinösen Übergang mittels Instrumentenknoten und vier Einzelkopfknoten eine Naht geknüpft, die ebenso der Fixierung in der Messkammer des Myograph diente. Die freien Fadenenden am proximalen und distalen Muskelpräparat wurden zwecks Fixierung in der Messkammer ebenso mit einem Instrumentenknoten und vier Einzelkopfknoten an je einem Kunststoffadapter fixiert. Über diesen Kunststoffadapter konnte das Muskelpräparat anschließend in der Messkammer eingehängt und fixiert werden (Abb. 10). Damit war das Muskelpräparat für die Funktionsmessung vorbereitet. Die Messkammer des Myographen wurde zuvor mit Aufzeichnungslösung befüllt, die auf 25°C erwärmt worden ist und ebenso kontinuierlich mit Sauerstoff begast wurde. Während der Muskelfunktionsmessung wurde die Aufzeichnungslösung kontinuierlich mittels Umwälzpumpe ausgetauscht.



Abb. 10 präparierter und eingespannter Musculus soleus

Bei der Platzierung der Naht (Abb. 10) war es von besonderer Bedeutung, dass diese möglichst am myotendinösen Übergang zu liegen kam und die Muskelfasern nicht berührt, um zum einen den Beitrag der Sehne bei der Kraftmessung zu minimieren und zum anderen ein Reißen der Muskulatur während der Stimulation zu vermeiden [189]. Die durchschnittliche Ischämiezeit der Präparation lag bei knapp 14 Minuten.

2.2.2 Aufbau und Funktionsweise des MyoDYNAMIC Muscle Strip System (Firma DMT)

Das *MyoDynamics Muscle Strip System* - 840MD (Abb. 11) ist ein modernes System zur *in vitro* Messung von exzentrischer, konzentrischer oder auch isometrischer Muskelaktivität an einzelnen Muskelfasern aber auch an vollständigen Muskeln mittels elektrischer Feldstimulation. Dazu besitzt der Myograph vier separate Kammern, in die der präparierte Muskel bzw. die Muskelfaser eingehängt werden können. Sobald der präparierte Muskel an dem dafür vorgesehenen Haken eingehängt wird, ist dieser darüber mit dem sensiblen Kraftmesser verbunden, der es erlaubt, minimale Veränderungen von 10 μm zu detektieren. Weiterhin kann der Muskel, entweder manuell oder über einen motorisierten Mikropositionierer, vorgedehnt bzw. die Muskelspannung reduziert werden. In jeder der vier separaten Kammern können verschiedene Parameter wie beispielsweise Temperatur, Stimulationsprotokoll und Wechsel des Aufzeichnungsmediums unabhängig voneinander eingestellt werden [190].

Der in dieser Arbeit genutzte Aufbau bestand aus dem *Myo-Interface* mit vier separaten Kammern zur Muskelmessung, einem Stimulator zur Muskelstimulation, einem *PowerLab data acquisition system* und der dazugehörigen *Software* zur Aufzeichnung und Auswertung der Muskelmessung (*LabChart 8*). Teil des Systems war ebenso eine Vakuum Pumpe, mit der ein automatisierter Wechsel der Aufzeichnungslösung in den Kammern möglich war, sodass die Muskulatur in der Kammer, je nach Setting, kontinuierlich mit O_2 begaster Aufzeichnungslösung umspült wurde. Die Vakuum Pumpe wurde mit einer 1000 ml Laborflasche verbunden, welche mit Aufzeichnungslösung befüllt worden war und kontinuierlich mit 95% Sauerstoff begast wurde, sodass das Muskelpräparat während und zwischen den Kraftmessungen dauerhaft mit Substrat und Sauerstoff versorgt wurde.

Der hier verwendete Muskelstimulator konnte ausschließlich mit der dazugehörigen *Software MyoPulse* gesteuert und kontrolliert werden. Dazu wurden über die *Software* die gewünschten Stimulationsparameter definiert und die Stimulation gestartet.



Abb. 11 Aufbau des Myographen im Labor

2.2.3 Ablauf der Messung und Messprotokoll

Da höhere Temperaturen mit einem erhöhten metabolischen Bedarf einhergehen, war es wichtig, die Temperatur der Aufzeichnungslösung in der Kammer während der gesamten Messung konstant zu halten. Daher wurde die Aufzeichnungslösung in den Messkammern über Heizelemente auf 25°C erwärmt und die Temperatur konstant gehalten. Damit konnte eine Instabilität des Muskelpräparates vermieden und eine unbeeinträchtigte Kraftmessung ermöglicht werden [189].

Die Messung maximaler isometrischer Kraft erfordert, dass alle Muskelfasern im Präparat zeitgleich kontrahieren, sodass zur Vorbereitung der eigentlichen Kraftmessung zunächst supramaximale Stimulationsbedingungen mittels *twitch stimulation* definiert werden mussten. Die hierzu genutzte Methode orientiert sich am Handbuch des Myographen und wurde im Verlauf der Arbeit optimiert [189]. Im Nachgang wurden die gemessenen Kraftwerte mittels kalibrierter Koeffizienten von Millivolt (mV) in Millinewton (mN) umgerechnet.

Definieren der optimalen Muskellänge (LO)

Die Definition der supramaximalen Stimulationsparameter beziehungsweise Stimulationsbedingungen begann mit der Einstellung der optimalen Muskellänge (LO), damit das Muskelpräparat nach Stimulation maximale isometrische Zuckungskraft aufbringen kann. Dazu wurde das Präparat mittels einer Einzelstimulation mit 16Volt (V) stimuliert und die Muskelantwort gemessen (Abb. 12) sowie quantitativ mittels *LabChart* ausgewertet. Zwischen den einzelnen Stimulationen wurde eine Pause von mindestens 30 Sekunden eingehalten. Anschließend wurde die Länge des eingespannten Muskelpräparates in kleinen Schritten verlängert beziehungsweise verkürzt, bis die maximale Zuckungskraft gemessen werden konnte. Die so erfasste optimale Muskellänge wurde zwischen den beiden myotendinösen Übergängen gemessen und notiert. Im Verlauf der Messungen wurde regelmäßig überprüft, ob die optimale Länge des Muskelpräparates eingestellt war.

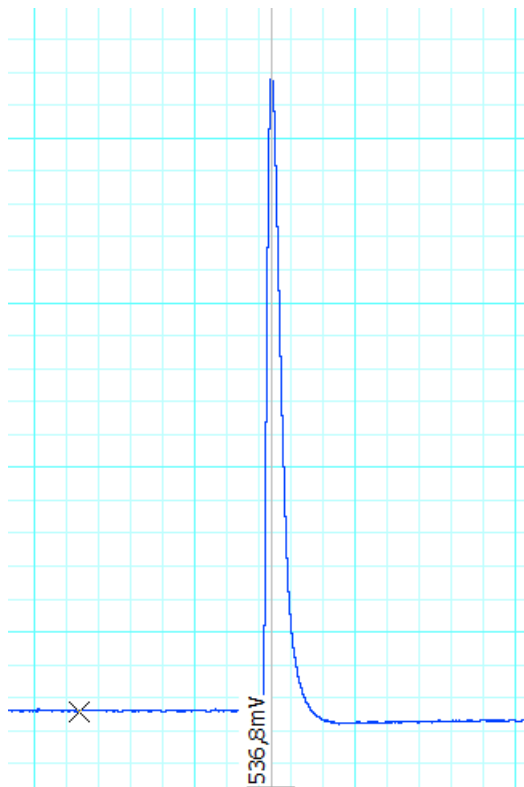


Abb. 12 Beispielhafte Einzelzuckung eines entnommenen M. soleus beim Einstellen der optimalen Muskellänge, x-Achse: gemessene Kraftantwort in mV, y-Achse: Zeit in Sekunden

Definieren der optimalen Stromstärke

Ein weiterer Parameter der supramaximalen Stimulationsbedingungen ist die optimale Stromstärke zur Stimulation der Muskelpräparate. Nachdem die optimale Muskellänge als Grundvoraussetzung eingestellt worden ist, wurde die optimale Stromstärke zur Bestimmung der maximalen isometrischen Kraft des Präparates ermittelt. Dazu wurde erneut die *twitch stimulation* genutzt und die Stromstärke je Stimulation um 2 Volt gesteigert, bis die maximale Kraftantwort des Präparates gemessen werden konnte. Auch hierbei wurde eine Pause von mindestens 30 Sekunden zwischen den einzelnen Stimulationen eingehalten.

Frequenz Kraft Zusammenhang

Ein weiterer Parameter der supramaximalen Stimulationsbedingungen ist die Stimulationsfrequenz, bei der die maximale isometrische Kraft gemessen werden konnte. Voraussetzung zur Bestimmung des Frequenz Kraft Zusammenhangs, war die Bestimmung und Einstellung der optimalen Muskellänge. Anschließend wurde das Muskelpräparat mit ansteigenden Frequenzen von 10 Hz bis maximal 250 Hz für 750ms gereizt (Abb. 13); dabei wurde eine Pause von vier Minuten zwischen den Stimulationsfrequenzen eingehalten. Sobald ein Plateau der Kraftkurve erreicht worden ist, konnte an diesem Plateau die maximale isometrische tetanische Kraft (PO) für die jeweilige Stimulationsfrequenz abgelesen werden. Die zur Erzeugung der maximalen isometrischen Kraft genutzte Stimulationsfrequenz wurde als Plateau Stimulationsfrequenz definiert. Anhand dieser Stimulationsfrequenz konnte folgend die maximale isometrische Kraft bestimmt werden.

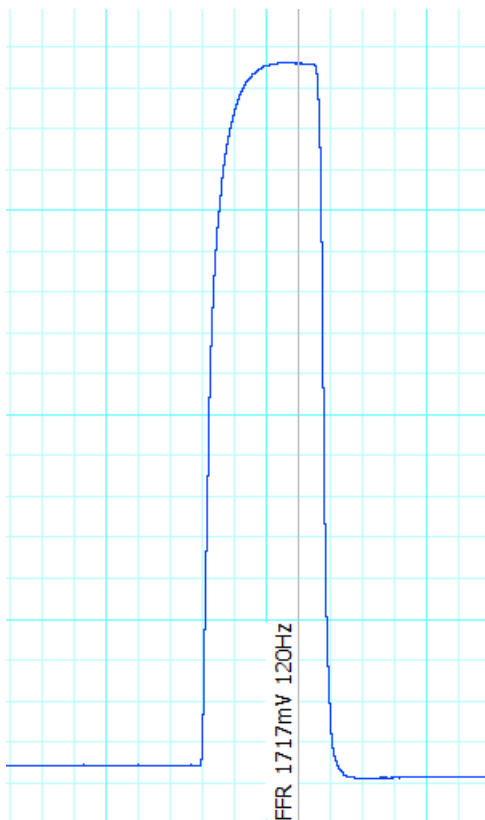


Abb. 13 beispielhaft tetanische Reizung eines isolierten M. soleus bei der Bestimmung der optimalen Stimulationsfrequenz
Reizung mit 120Hz, x-Achse: gemessene Kraftantwort in mV, y-Achse: Zeit in Sekunden

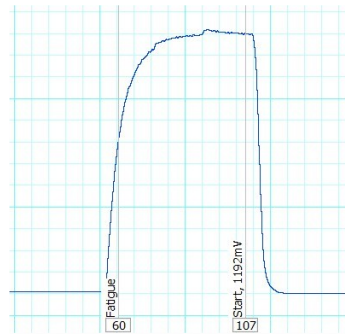
Messung der maximalen isometrische Kraft (PO)

Nachdem nun die Parameter für die supramaximalen Stimulationsbedingungen definiert worden sind, wurde zur Bestimmung der maximalen isometrischen Kraft die Muskulatur in der Messkammer des Myographen bei optimaler Länge mit supramaximaler Stromstärke und Plateau Stimulationsfrequenz stimuliert. Die Muskelpräparate wurden mit den so definierten Stimulationsparametern zweimalig stimuliert, mit einer vierminütigen Pause zwischen den Stimulationen. Die gemessene Muskelantwort wurde mittels *LabChart* quantitativ ausgewertet.

Abschließend wurden die Präparate aus den Kammern entfernt und deren Masse bestimmt, damit im weiteren Verlauf die spezifische Kraft durch Normierung auf die Muskelquerschnittsfläche errechnet werden konnte. Zur Bestimmung der Muskeleinzelgewichte wurden die Sehnen sowie überschüssige anhaftende Aufzeichnungslösung entfernt.

Ermüdungsprotokoll

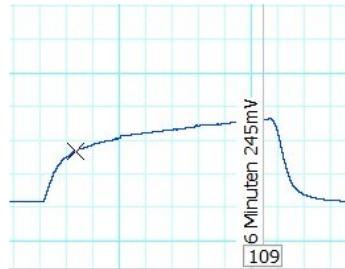
Die Arbeitshypothese dieser Arbeit lautet, dass ein vermehrter Gehalt an *Lipid Droplets* (LD) in der Muskelfaser eine Auswirkung auf die aktive Kraftentwicklung und die Ermüdung bei dauerhafter Muskeleerregung hat. Dazu wurden die Muskelpräparate nach der oben beschriebenen Messung der maximalen isometrischen Kraft repetitiv stimuliert und die Entwicklung der Muskelkraftantwort über die Zeit beobachtet. Die Muskelpräparate wurden alle 3 Sekunden durch einen 300 ms dauernden Reiz mit 50 Hz stimuliert wobei mindestens 50% der maximalen Kraftantwort erreicht werden sollte [191]. Während des Ermüdungsprotokolls wurden die Muskelpräparate kontinuierlich über 30 Minuten mit dem oben genannten Protokoll stimuliert sowie die Muskelantwort kontinuierlich über die Zeit aufgetragen (Abb. 14 und 15). Bei der Erstellung und Ausarbeitung des Protokolls wurde sich an einer Publikation von Oishi et al orientiert [191]. Dabei sollte nach zehn Minuten repetitiver tetanischer Reizung ein Niveau von 15% des Ausgangswertes der initialen Muskelantwort erreicht werden. Dies diente der Erfolgskontrolle des Stimulationsprotokolls. Daher wurde das Erreichen sowie der Zeitraum bis zum Erreichen von 15% des Ausgangswertes der initialen Muskelantwort hier als Muskeleermüdung definiert. Da die isolierten Muskelpräparate der DIOSTZ- und STZ- Versuchstiergruppen eine langsamere Abnahme der Muskelkraft zeigten und nach zehn Minuten die 15% Marke nicht erreichten, wurde das Ermüdungs- Protokoll auf 30 Minuten verlängert. Während der Messung wurde die Kraftabnahme über die Zeit von 30 Minuten protokolliert und die Zeit bis zum Eintreten der Muskeleermüdung (15% des Ausgangswertes) als Vergleichswert für alle Gruppen notiert. Zudem wurden absolute und relative Kraftwerte der Muskulatur während der Ermüdungsmessung in zeitlichen Abständen von drei Minuten miteinander verglichen.



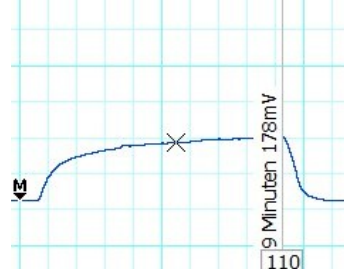
Beginn der Ermüdungsmessung



Muskelantwort nach drei Minuten



Muskelantwort nach sechs Minuten



Muskelantwort nach neun Minuten

Abb. 14 Darstellung der tetanischen Ermüdungsmessung am Beispiel eines M. soleus aus einem Tier der Kontrollgruppe; dargestellt ist bei gleichbleibender Skalierung beispielhaft die Abnahme der Kraft der Einzelzuckung im Ermüdungsprotokoll nach 0, 3, 6 und 9 Minuten, hier wurde beispielhaft nach 9 Minuten noch 14,9% der initialen Kraftantwort generiert, x-Achse: gemessene Kraftantwort in mV, y-Achse: Zeit in Sekunden

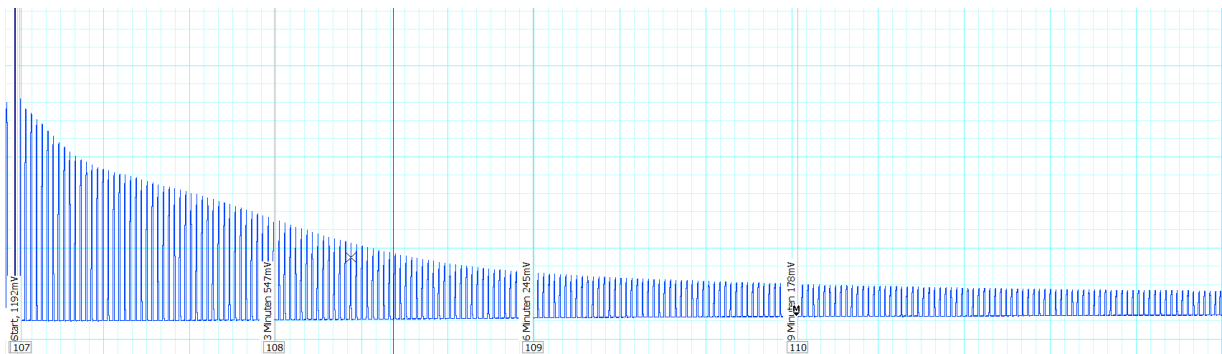


Abb. 15 Darstellung der Ermüdungsmessung am Beispiel eines M. soleus aus einem Tier der Kontrollgruppe, dargestellt ist beispielhaft die Abnahme der Kraft der Einzelzuckung nach repetitiver Reizung über 11 Minuten, x-Achse: gemessene Kraftantwort in mV, y-Achse: Zeit in Minuten

2.2.4 Berechnung der spezifischen Kraft (sPo)

Trotz größter Sorgfalt bei der Präparation und der Bearbeitung der isolierten Muskulatur, kann die Größe der Präparate auch aufgrund anatomischer Gegebenheiten variieren. Wenn man annimmt, dass ein größerer Muskel auch mehr Kraft produziert, erscheint es sinnvoll, die gemessene Kraftantwort zu normieren und damit vergleichbar zu machen. Die aufgebrachte maximale isometrische tetanische Kraft des Muskelpräparates (PO) wurde daher auf die Querschnittsfläche des Muskels bezogen und damit die spezifische Kraft (sPO) berechnet [192],[191]. Die sPO wurde in dieser Arbeit rechnerisch ermittelt, wozu zunächst die optimale Faserlänge berechnet werden musste, damit im Anschluss eine Normierung auf die Muskeleinzelgewicht und Muskellänge erfolgen konnte. Zur Berechnung der sPO wurde sich am Benutzerhandbuch des Myograph sowie einer Übersichtsarbeit von Upchurch und Iazzo orientiert [189],[192].

Bestimmung der optimalen Faserlänge (FL)

$$FL = Lo * \frac{\text{Faserlänge}}{\text{Muskellänge}}$$

Formel 1: Berechnung der optimalen Faserlänge

Das Verhältnis von Muskellänge zu Faserlänge wurde von Brooks & Faulkner für verschiedene Muskeln bestimmt und für die Berechnung aus deren Arbeit *Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice* entnommen und mit 0,71 für den M. soleus gewertet [193]. Neben der optimalen Faserlänge gehen weiterhin die Muskelmasse m sowie die Dichte in die Normierung mit ein. Im weiteren Verlauf wird das Ergebnis dieses Rechenschrittes als *Cross Sectional Area* (CSA) bezeichnet.

Nachdem die optimale Faserlänge bestimmt worden ist, konnte die *Cross Sectional Area* des Muskelpräparates bestimmt werden:

$$CSA = \frac{\text{Muskelmasse } m}{FL * 1,06\text{mg/mm}^3}$$

Formel 2 Berechnung Cross Sectional Area

Zur Berechnung der *specific Force* (sPO) ergibt sich folgende Formel:

$$sFO = \frac{PO}{CSA} = \frac{PO}{\frac{\text{Muskelmasse } m}{FL * 1,06\text{mg/mm}^3}}$$

Formel 3 Berechnung spezifische Muskelkraft

Wobei 1,06mg/mm³ für die Dichte der Skelettmuskulatur steht.

Da die Präparation und das Einspannen der Muskulatur komplex und vielschrittig war, wurden zur Verringerung von Fehlern Ausschlusskriterien definiert, die zu einem Ausschluss des Versuchstiers von der Datenauswertung führten. Diese Ausschlusskriterien waren eine zu lange Ischämiezeit mit

Auswirkung auf die Ergebnisse der Muskelmessung oder eine mangelhafte Präparation des M. soleus, beispielsweise wenn während der Präparation der Muskel selbst beziehungsweise die Sehne des Muskels riss, sodass keine valide Messung im Anschluss möglich war. Andere Besonderheiten mit Auswirkungen auf die Muskelmessung wie z.B. eine perforierte Arteria carotis in der vorausgehenden Herzkatheter-Untersuchung führten ebenso zu einem Ausschluss.

Wenn zwei M. solei vom selben Tier gemessen wurden und keine Ausschlusskriterien vorlagen, wurden die Werte für die PO beziehungsweise sPO gemittelt. Somit wurden zwei Datensätze für ein Tier ermittelt. Die gemessenen Werte der beiden M. solei wurden im Anschluss gemittelt.

Die Versuchstiere mit und ohne Herzkatheter Untersuchung wurden jeweils zu einer Versuchsgruppen (Kontrolle, DIOSTZ, STZ) zusammengefasst, wodurch die Anzahl der gemessenen Tiere erhöht werden konnte. In der Kontrollgruppe wurden aus den oben genannten Gründen zwei Tiere ausgeschlossen, sodass insgesamt fünf Tiere gemessen werden konnten. In der DIOSTZ- Versuchsgruppe wurde lediglich ein Versuchstier von der Auswertung ausgeschlossen und so insgesamt sieben Versuchstiere ausgewertet. In der STZ- Versuchsgruppe wurde kein Datensatz von der Auswertung ausgeschlossen, sodass schließlich neun Tiere ausgewertet worden sind.

2.2.5 Kryokonservierung und histologische Aufarbeitung

In dieser Arbeit wurden Schnitte des M. soleus der Versuchstiere aus den drei verschiedenen Versuchsgruppen angefertigt. Dabei wurde je ein M. soleus des Versuchstieres wie beschrieben für die Kraftmessung isoliert und vorbereitet, der jeweils kontralaterale M. soleus wurde hingegen für die histologische Aufarbeitung kryokonserviert. Da es für die Ergebnisse der Muskelmessung unerlässlich ist, die Ischämie Zeit der Muskulatur zu minimieren, wurde hier auf die im Vergleich zur Formaldehyd-Paraffin Einbettung schnellere Kryokonservierung zurückgegriffen. Ebenso vorteilhaft war der Verzicht auf das toxische Formaldehyd und der adäquate Erhalt der nativen Antigen Strukturen, da die Konservierung durch Einfrieren erfolgte und keine Interaktion der Proteine mit Formaldehyd erfolgte [194]. Da die angefertigten histologischen Muskelpräparate im Verlauf auch mittels immunologischer Methoden gefärbt wurden, wurde die Kryokonservierung gegenüber einer Formaldehyd- Paraffin Konservierung favorisiert.

Nachdem der Muskel, wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, aus dem Versuchstier isoliert worden war, wurde dieser mehrfach in *Optimum Cutting Temperature compound* (OCT) getaucht und somit die gesamte Muskeleoberfläche mit OCT bedeckt. Anschließend wurde das Präparat in der physiologischen Orientierung entlang der *head-to-tail* Achse und ungedehnt in die Form zum Einfrieren abgelegt. Im Anschluss daran wurde flüssiger Stickstoff genutzt um in einer Stahlform Isopentan auf -150°C zu kühlen. Dazu wurde die Stahlform für ungefähr drei bis fünf Minuten in flüssigen Stickstoff gehalten und das Isopentan dabei konstant gerührt, bis sich auf dem Boden der Stahlform weiße Präzipitate bildeten. Die weißen Präzipitate waren der Indikator dafür, dass die optimale Einfriertemperatur von -150°C erreicht worden ist. Anschließend wurden die Muskelpräparate in der Form zum Einfrieren für ungefähr zehn Sekunden in das -150°C kalte Isopentan getaucht. Dabei wurde die Zeitspanne von maximal zwölf Sekunden nicht überschritten und somit ein zu langes Einfrieren, was zu Muskelbrüchen führen kann und damit die Auswertung beeinflussen kann, vermieden. Abschließend wurde der eingefrorene Muskel für 20 Minuten auf Trockeneis unter dem Abzug positioniert, damit das Isopentan verdampfen konnte. Nachdem das Isopentan verdampft war, wurde das kryokonservierte Präparat bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung gelagert [194].

Einbettung

Zur Einbettung der bei -80°C eingefrorenen und gelagerten Präparate wurden diese über Nacht bei -20 °C gelagert, um ein Schneiden der Präparate zu ermöglichen. Während der gesamten Einbettung war es wichtig, dass die Präparate nicht auftauen, um Schäden durch erneutes Einfrieren zu vermeiden. Nachdem das Kryotom auf -22°C gekühlt wurde, konnten die Präparate auf der *Specimen Disc* fixiert werden. Dazu wurde das Präparat in einer flüssigen Schicht aus OCT auf der *Specimen Disc* positioniert und durch Gefrieren des OCT fixiert. Dabei wurde das Präparat für Querschnitte senkrecht auf der *Specimen Disc* positioniert [194].

Anfertigung der Schnitte und Färbung

Die Schnitte wurden bei einer Temperatur von -22°C durchgeführt, um ein Auftauen des Muskelpräparats währenddessen zu vermeiden. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 8 µm-10 µm vom Gewebeblock abgetrennt. Die Schnitte wurden auf einem -22°C kalten Objektträger gesammelt und anschließend mittels Haartrockner für fünf Minuten getrocknet, ohne die Muskelschnitte dabei zu erwärmen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in einer Trockenbox gelagert, die zur Vermeidung von Feuchtigkeit zusätzlich mit Klebeband verschlossen worden ist. Für die weitere Analyse wurden die Schnitte aus dem mittleren Muskelbauch des Präparates angefertigt. Die histologischen Schnitte wurden zunächst wieder bei -20°C bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert.

Um die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungsprotokolle auf die Muskelfaser-Zusammensetzung der M. solei zu erfassen, wurden die Muskelfasertypen I, IIa und IIb immunhistochemisch angefärbt. Zudem wurde die Verteilung der Muskelfasertypen in den einzelnen Versuchsgruppen in Bezug zur *Fatigue*- Messung gesetzt. Zur Anfärbung der Muskelfasern in den histologischen Schnitten wurden diese langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Dazu wurden die Proben zunächst über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert und am Morgen für ungefähr 60 Minuten bei Raumtemperatur akklimatisiert. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Daran schloss sich ein Waschschriff mit *phosphate buffered saline* (PBS) an, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit 1% Triton X-100 Lösung, die dazu diente, den Erfolg der Immunofluoreszenz Färbung durch Permeabilisierung der Zellmembranen zu verbessern [195]. Vor der Hinzugabe des primären Antikörpers wurden die Schnitte zunächst mit 10% *normal goat Serum* (NGS) in Kombination mit 1% Triton in PBS blockiert; weiterhin folgte nach einem erneuten Waschschriff mit PBS/ Tween20 (0,2%) sowie mit PBS im Anschluss eine endogene Immunglobulin G Blockade mittels Anti- Maus Fab-Fragmenten. Die endogene Immunglobulin G Blockade diente dem Zweck, gebundene endogene Immunglobuline der Klasse G auf dem Gewebeschnitt zu blockieren und somit eine Anfärbung des Hintergrundes zu vermeiden, sodass die Qualität der Immunhistochemie Färbung verbessert werden konnte. Bevor sich ein erneuter Waschschriff in PBS und Tween20 (0,2%) anschloss, wirkte die endogene Immunglobulin G Blockade drei Stunden ein. Die primären Antikörper zur Färbung der Muskelfasertypen I, IIa und IIb wurden in 2% NGS gelöst und über Nacht bei 4°C mit dem histologischen Präparat inkubiert. Bevor der sekundäre Antikörper hinzugegeben werden konnte, wurden die Gewebeschnitt erneut mit PBS und Tween20 (0,2%) gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenso in 2% NGS gelöst und für drei Stunden hinzugegeben. Es folgte ein erneuter Waschzyklus mit PBS. Damit war der Prozess der immunhistochemischen Färbung abgeschlossen. Für die Versiegelung der Objektträger wurde das Eindeckmedium Fluoromount-G der Firma *Southern Biotech* genutzt, was eine längerfristige Lagerung der Gewebeschnitte ermöglichte. Abschließend wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop *Keyence BZ 9000C* die Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt und die Muskelfasertypen quantitativ ausgewertet. Dazu wurden in den Muskelschnitten repräsentative Ausschnitte ausgewählt und anschließend gemäß der immunhistochemischen Färbung die Anzahl der Muskelfasern je Typ gezählt und relativ ins Verhältnis

zueinander gesetzt. Abschließend wurden die Ergebnisse mittels *One- Way Anova* mit Bezug auf die Kontrollgruppe auf statistische Aussagekraft hin untersucht.

Immunhistochemische Färbung der Perilipine

Zur Analyse des intramuskulären Fettgehalts und der *Lipid Droplets* wurden die Perilipine 2 und 5 in den histologischen Schnitten immunhistochemisch angefärbt. Dazu wurden die Muskelschnitte zunächst, wie bei der Muskelfasertypen Bestimmung, langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend erfolgte nach der Abgrenzung der einzelnen Schnitte mittels Fettstiftes die Fixierung mit 4% PFA. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Muskelschnitte mittels 10% NGS in PBS mit 0,2% Saponin für zwei Stunden blockiert. Das Saponin wurde zur Permeabilisierung der Zellmembranen hinzugegeben, sodass die Antikörperbindung erleichtert wurde. Nun wurde der primäre Antikörper in PBS/Saponin 0,2% verdünnt sowie im Anschluss über Nacht bei 4°C auf die Proben gegeben. Am folgenden Tag wurden die Objektträger zunächst dreimalig in PBS/Saponin 0,2% gewaschen und der fluoreszierende Sekundärantikörper (maximale Emission: 570 nm) für drei Stunden hinzugegeben. Logischerweise erfolgten die weiteren Schritte nach Hinzugabe des Fluoreszenzantikörpers im Dunkeln. Nach einem weiteren Waschzyklus mit PBS wurden die Muskelschnitte mit Fluoromont DAPI eingedeckt und über Nacht bei 4°C gelagert, bis das Fluoromont eingetrocknet war. Abschließend wurde nun ebenso mit dem Fluoreszenzmikroskop *Keyence BZ 9000C* die Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt und die immunhistochemische Färbung der Perilipine ausgewertet. Zwecks Auswertung wurden je Schnitt drei *Region of Interests (ROI)* von 150 µm mal 150 µm ausgewählt und innerhalb der *ROI* mittels *ImageJ* sowohl die Fläche der gefärbten Perilipine als auch die gesamte Fläche des markierten *ROI* bestimmt, sodass abschließend die ermittelte Fläche der gefärbten Perilipine in Bezug zur Gesamtfläche des *ROI* gesetzt werden konnte.

2.2.6 Proteinbiochemie

Solubilisierung der Proben

Zur Solubilisierung der Gewebeproben wurde zunächst ein Uhrglas auf Eis gelegt und gekühlt, um darauf schließlich die Proben bearbeiten zu können. Aus den bei -80°C gelagerte Muskelpräparaten wurden auf dem gekühlten Uhrglas kleinere Proben herausgeschnitten und diese anschließend mit einem modifizierten Laemmlipuffer gemischt. Der modifizierte Laemmlipuffer wird im Weiteren als Titin Probenpuffer bezeichnet. Die mit Titin Probenpuffer vermengten Muskelproben wurden anschließend fein zerkleinert, bei 96° C für 3 Minuten denaturiert und schließlich mittels Bradford Lösung auf 1:2500 verdünnt. Abschließend wurde eine Bradford Analyse zur photometrischen Bestimmung der Konzentration der Probe in Lösung durchgeführt. Für die photometrische Messung spielt das *Coomassie Brilliant Blue* eine entscheidende Rolle. Dieser Farbstoff bindet an Proteine beziehungsweise an Seitenketten von Aminosäuren in den Proteinen und verändert durch die Proteinbindung seinen Extinktionskoeffizient. Die proteingebundene Form hat einen deutlich höheren Extinktionskoeffizient, sodass durch eine photometrische Messung bei 595nm eine hohe Sensitivität im Nachweis von Proteinen erreicht wird [196]. Zur besseren Bindung von *Coomassie Brilliant Blue* an die Proteine wird zusätzlich das Reduktionsmittel DTT hinzugeben, das die Disulfid Brücken durch Reduktion löst und die Proteinfaltung dadurch aufbricht [197].

Polyacrylamid Gelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid Gelektrophorese wurde genutzt, um Proteine anhand ihrer Größe aufzutrennen. Dies war notwendig, damit Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen mittels Antikörper sichtbar gemacht werden konnten. Um die Proteine aufzutrennen, wurden je nach Proteingröße unterschiedlich konzentrierte Trenngele verwendet. Das Prinzip wird nun im Folgenden kurz erläutert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Polyacrylamid Gele als Trägermaterial genutzt und dafür zwischen zwei Glasplatten mit 0,75mm Abstand gegossen [198]. Polyacrylamid wurde genutzt, da es durch Polymerisation enge Poren bildet aber zeitgleich chemisch und physikalisch inert ist und sich somit als Trennmedium ideal eignet [199]. Zur Ausbildung der beschriebenen Poren wurde Polyacrylamid mit dem Vernetzer Methylenbisacrylamid (Bis) über radikalische Polymerisation quervernetzt und polymerisiert. Dabei diente Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter, das in Gegenwart von Tetramethylethyldiamin (TEMED) Radikale abspaltet und dadurch die Polymerisation von Polyacrylamid startete [199]. Die Porengröße konnte durch die Konzentration von Polyacrylamid beeinflusst werden, sodass höhere Konzentrationen von Acrylamid zu engeren Poren führen [198], [199]. In der vorliegenden Arbeit wurden 7,5% und 10% Polyacrylamid Gele genutzt, um eine bessere Auftrennung im gewünschten Kilodalton (kDa) Bereich zu erreichen. Damit konnte die Proteinkinase C mit einem Proteingewicht im Bereich von 77kDa sowie die Perilipine mit einem Proteingewicht im Bereich von ungefähr 50kDa als auch Aktinin mit einem Proteingewicht im Bereich von 100kDa in dem Polyacrylamid Gel hinreichend aufgetrennt werden. Die Polyacrylamid Gele (Tab. 9) bestanden aus einem Trenngel zur Auftrennung der Proteine und einem Sammelgel zum Sammeln der Proteinproben. Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasscheiben pipettiert und die Aushärtung abgewartet. Während der Aushärtung wurde eine Phase Isopropanol auf das aushärtende Trenngel gegossen, um dieses von der Luft abzuschließen und somit die Bildung von Luftblasen zwischen Sammel- und Trenngel zu vermeiden. Nachdem das Polyacrylamid Gel auspolymerisierte, wurde zunächst ein das restliche Isopropanol abgeschüttet und zur Sammlung der Proben ein Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Diese Komposition aus Sammel- und Trenngel wird im Weiteren auch als Standardgel bezeichnet.

Polyacrylamid als Trenngel und das Sammelgel wurden wie folgt hergestellt:

Trenngel:

Lösung	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Sammelgel
30% Acrylamid/ Bis	3,75 ml	5 ml	1,334 ml
Bidestilliertes H ₂ O	7,5 ml	6,25 ml	6,05 ml
4x SDS Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	-
4x SDS Sammelgelpuffer	-	-	2,5 ml
Temed	7,5 µl	7,5 µl	30 µl
APS	75 µl	75 µl	100 µl

Tabelle 9 Zusammensetzung Standard Polyacrylamid Gel

Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) bei der Herstellung der Gele sowie zum Laufpuffer wurden die Proteine denaturiert und sowohl hydrophobe Wechselwirkungen der Proteinreste als auch Protein-Protein Interaktionen aufgelöst [198]. Dadurch ließen sich die Proteine durch eine Gelektrophorese auftrennen.

Da Titin mit 4,2 Megadalton (MDa) das größte Protein des menschlichen Körpers ist [30], wurden zur Größenauftrennung von Titin größere Poren benötigt. Daher wurde folglich weniger Acrylamid in den Gelen verwendet, sodass zur Stabilisierung der Gele zusätzlich Agarose hinzugegeben werden musste.

Zur Auftrennung des Proteins Titin wurden die 2,2-prozentigen agarosehaltigen Trenngele wie folgt hergestellt:

Lösung	2,2% Titingel
30% Acrylamid/ Bis	1,46 ml
Bidestilliertes Wasser	6,61 ml
4x SDS Trenngelpuffer	5 ml
SDS 20%	100 µl
Temed	11,5 µl
APS	150 µl
Agarose 1,5 %	6,67 ml

Tabelle 10 Zusammensetzung Titin Polyacrylamid Gel

Zur Herstellung der Titingele (Tab. 10) 1 wurden im ersten Schritt alle Bestandteile, außer APS und Agarose, in einem 50 ml *Falcon* im Wasserbad auf 48°C erwärmt. Anschließend wurde die 1,5-prozentige Agarose in der Mikrowelle so lange erhitzt bis diese kurz siedete und ebenso der Mischung im Wasserbad hinzugefügt. Abschließend wurde APS hinzugefügt und die fertige Mischung zügig zwischen zwei vorbereitete Glasplatten pipettiert. Die Aushärtung erfolgte in der Regel innerhalb von 90 Minuten bei Raumtemperatur. Um die Qualität der Gele zu verbessern, wurden sowohl die Standardgele als auch die Titingele über Nacht bei 4°C und hoher Luftfeuchtigkeit gelagert.

Um die Proteine nach oben beschriebener Vorbereitung der Größe nach aufzutrennen, wurden diese auf das Trägermaterial aufgetragen und an das Trägermaterial elektrische Spannung angelegt. Dies hatte zur Folge, dass die Proteine im Trägermaterial gemäß ihrer Ladung und Molekülmasse im elektrischen Feld von der Anode zur Kathode wanderten. Da SDS negativ geladen ist und dieses mit den denaturierten Proteinen Komplexe bildet, ist die Gesamtladung der Protein- SDS- Komplexe negativ. Dies ist wichtig, da somit alle Protein-SDS Komplexe negativ geladen sind und die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode damit von der Größe der Proteine abhängig ist. Die Größe der Proteine ist nahezu proportional zur molekularen Masse, sodass mittels einer Referenzprobe die Molekülmassen der Proteine bestimmt werden können [198]. Sowohl die SDS PAGE für Titin als auch für alle anderen Proteine wurden in 1x Laufpuffer mit Mini-Protean Tetra Systemen der Firma Biorad durchgeführt. Allerdings unterschied sich die angelegte Stromstärke, sodass die Titin SDS PAGE zum Einlaufen mit 2 Milliampere (mA) pro Gel begonnen wurde, was im Anschluss nach 30 Minuten auf 8mA pro Gel gesteigert worden ist. Die SDS-Page für alle anderen Proteine wurde zum Einlaufen der Proteinproben mit 15 mA pro Gel begonnen und beibehalten bis die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel übergegangen waren. Im Verlauf wurde dann die Stromstärke auf 30mA pro Gel gesteigert und für 90 Minuten beibehalten. Im weiteren Verlauf wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot weiterverarbeitet.

Isoformen

Zum Nachweis von möglichen Unterschieden in der Titin Isoform N2A in der Skelettmuskulatur zwischen den Versuchsgruppen STZ und DIOSTZ, wurden die Isoformen angefärbt und anschließend mittels dem *Imager Fusion FX* der Firma Vilber dargestellt. Als Vergleichsprobe und Referenzbande wurden solubilisierete Proben der Kontrollgruppe genutzt. Die Anfärbung der Isoform wurde mit *Imperial Stain*, das als Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 enthält, durchgeführt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 bindet sehr sensitiv an die Proteine und färbt die Protein- Banden des Titin- Polyacrylamid Gel an, was im Anschluss durch den *Imager* sichtbar gemacht werden konnte. Dazu wurde das Titin- Polyacrylamidgel nach der Gelelektrophorese in einer Schale mit bidestilliertem Wasser gewaschen und im Anschluss daran mit *Imperial Stain* für eine Stunde auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Färbelösung entfernt und gegen bidestilliertes Wasser ausgetauscht. Das Gel wurde erneut auf dem Orbitalschüttler positioniert; nach einer weiteren Stunde wurde das bidestillierte Wasser

abermals ausgetauscht und das beladene Titingel für mindestens zwei weitere Stunden in bidestilliertem Wasser entfärbt. Zuletzt wurde das gefärbte Titin- Polyacrylamid Gel im Coomassie Mode für 80 bis 120ms belichtet und die Isoform- Anfärbung im Vergleich der Versuchsgruppen analysiert.

Western Blot

Bevor Proteine, beziehungsweise deren Veränderungen, mittels Chemolumineszenz nachgewiesen und sichtbar gemacht werden konnten, mussten die aufgetrennten Proteine mittels *Blotting* von dem Trägermedium auf eine PVDF- Membran (Polyvinylendifluorid – Membran) übertragen werden. Dazu wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System der Firma BioRad genutzt. Das Übertragen der aufgetrennten Proteine von den Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte wiederum mittels elektrischer Spannung, durch die ein elektrisches Feld erzeugt wird, das senkrecht zur Oberfläche des Gels angelegt wurde. Zunächst wurden dafür fünf in Anodenpuffer getränkte *Whatman* Papiere auf der Anode des Trans-Blot Turbo Transfer System positioniert. Anschließend wurde eine PVDF-Membran vorsichtig durch Eintauchen in Ethanol aktiviert. Dabei musste für eine gute Auswertbarkeit darauf geachtet werden, die Membran nicht durch unerwünschte Proteine zu kontaminieren. Nach der Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese auf den in Anodenpuffer getränkten *Whatman* Papieren abgelegt und im Anschluss das Polyacrylamid Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf der PVDF-Membran positioniert. Um den Stromfluss beim Vorgang des *Blottens* zu gewährleisten, wurde das Polyacrylamidgel abschließend mit fünf in Kathodenpuffer getränkten *Whatman* Papiere bedeckt. Als letzter Schritt wurden beim Transfer der Proteine störende Luftblasen durch vorsichtiges Ausrollen entfernt, sodass die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran nicht gestört wurde. Zur Übertragung der Titin Proben aus dem Titingel auf die PVDF-Membran wurde eine Stromstärke von 1,0 Ampere (A) und eine maximale Spannung von 20 V für 40 Minuten angelegt. Die Übertragung aller anderen nicht-Titin Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte mit 1,5 Ampere und einer maximalen Spannung von 20 V für 12 Minuten. Nach dem *Blotten* befanden sich die aufgetrennten Proteinproben auf der PVDF-Membran, die zur weiteren Analyse genutzt wurde. Die weitere Analyse der Proteine umfasste Färbung, Chemolumineszenz sowie eine Analyse der Isoformen des Titins.

Chemolumineszenz

Nach dem Übertragen der Proteine aus dem Trenngel auf die PVDF- Membran wurden mittels Primär- und Sekundärantikörper nach dem Prinzip des Enzymimmunoassays und über Chemolumineszenz Veränderungen der Proteine beziehungsweise des Titins sichtbar gemacht. Da die Antikörper- Antigen Bindung spezifisch ist, ist die Methode des *Western Blots* sehr sensitiv und geeignet bekannte Proteinveränderung beziehungsweise Proteine nachzuweisen [198].

Nach dem *Blotten* wurden die PVDF- Membranen mit den aufgetrennten Proteinen zunächst kurz in bidestilliertem Wasser gewaschen und im Anschluss daran mit der PVDF Stain Lösung eingefärbt. Zur Färbung wurden die Membranen auf dem Orbitalschüttler positioniert. Titingele wurden für drei Minuten eingefärbt, Standardgele wurden für eine Minute eingefärbt. Die PVDF Stain Lösung enthält den Farbstoff COOMASSIE® Brilliant-Blau G-250, der wie bereits beschrieben an Proteine bindet und somit die Proteinbanden auf der PVDF-Membran nach Entfärbung des Hintergrunds sichtbar macht. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde die Membran für fünf Minuten mit der PVDF Destain Lösung auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Der Farbstoff wurde dadurch wieder von der Membran gewaschen, sodass nur der proteingebundene Farbstoff zurückblieb und somit die Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht wurden. Dies diente zum einen einer Erfolgskontrolle des *Blottens* und zum anderen wurden die Membranen im Anschluss geschnitten und damit verkleinert, um die Antikörper Bindung zu verbessern. Bei den Standard SDS Polyacrylamid Gelen wurde zur besseren Orientierung ein SDS Page Farbmarker aufgebracht, anhand dessen ungefähr abgeschätzt werden konnte welches Molekulargewicht die übertragenen Proteine in diesem Bereich der PVDF-Membran aufwiesen. Nachdem die Membranen

geschnitten wurden, wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in *Tris buffered Saline* + Tween (TBST) gewaschen, sodass möglicher Schmutz sowie das SDS ausgewaschen wurden. Zum Waschen wurden die Membranen zusammen mit fünf ml TBST in 50ml Falcons auf dem Rollmischer abgelegt. Das SDS muss ausgewaschen werden, um im Anschluss eine Antikörperbindung an das Zielantigen zu ermöglichen. Durch die Entfernung von SDS können die Proteine ihre ursprüngliche Faltung und Struktur wieder einnehmen, womit eine Bindung des Antikörpers an das Zielantigen ermöglicht wird [198]. Im Anschluss an das dreimalige Waschen mit TBST wurde die Membran für mindestens zwei Stunden mit zweiprozentigem Bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren und die PVDF-Membran zu blockieren. Nachdem die PVDF-Membran blockiert worden ist, wurde der Primärantikörper in 0,5% BSA verdünnt, hinzugegeben und über Nacht auf dem Rollmischer mit der PVDF-Membran in Kontakt gebracht. Am nächsten Tage wurde nach dreimaligem Waschen mit TBST anschließend der mit Merrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper hinzugegeben, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Dieser wurde nach zwei Stunden wieder entfernt, gefolgt von einem weiteren Waschzyklus mit TBST. Anschließend folgte das *Imaging* nach dem im Verlauf beschriebenen Prinzip der Chemolumineszenz. Dazu wurden das Chemolumineszenzreagenz A und B (ECL Ultra Western HRP Substrate HRP Solution A und B) zunächst im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und anschließend gleichmäßig auf die PVDF-Membran aufgebracht, sodass im Anschluss mit dem *Imager* Fusion FX die Lichtsignale detektiert werden konnten.

Nach dem Prinzip des Enzymimmunoassays wurde zunächst ein Primärantikörper gegen das zu untersuchende Protein beziehungsweise gegen die nachzuweisende Proteinphosphorylierung eingesetzt. Dieser Primärantikörper wird aus einer anderen Tierspezies gewonnen als der Sekundärantikörper. Nachdem die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert wurde und überschüssiger Antikörper entfernt worden ist, wurde die Probe mit einem Sekundärantikörper, der gegen den FC-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist und wiederum aus einer anderen Tierspezies gewonnen wurde, inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit einer Merrettichperoxidase gekoppelt, die durch geeignetes Substrat über Chemolumineszenz ein Lichtsignal generiert. Dieses Lichtsignal kann mit dem *Imager* erfasst und graphisch dargestellt werden [198].

Das Titin wurde mittels Antikörper auf eine Phosphorylierungsveränderung an Position pS11878 analysiert und gegen den bereits beschriebenen PEVK Pan Antikörper verglichen. Des Weiteren wurde die Proteinkinase C α (PKC α) auf eine Phosphorylierungsveränderung an Position T497 untersucht und ebenso gegen einen Antikörper, der sowohl phosphorylierte als auch unphosphorylierte PKC α bindet, verglichen.

Für die Phosphorylierungsanalyse wurde zunächst ein phosphorylierungsspezifischer Antikörper eingesetzt, der anschließend mit der Bindung eines gegen das Protein gerichteten Gesamt-Antikörpers verglichen wurde, wobei die identische PVDF-Membran verwendet werden konnte. Der phosphorylierungsspezifische Antikörper bindet, wenn eine Phosphorylierung des Zielepitops vorliegt, in diesem Fall die Position T497 der PKC α sowie die Position S11878 des Titins. Der Gesamtantikörper bindet an das Protein, auch wenn dieses nicht phosphoryliert war. Abschließend wurden die generierten Lichtsignale des phosphorylierungsspezifischen Antikörpers gegen die Signale des Gesamt-Antikörpers ins Verhältnis gesetzt. Dazu musste zunächst der phosphorylierungsspezifische Antikörper nach dem *Imaging* wieder von der PVDF-Membran entfernt werden. Hierzu wurden für Titingele und Standardgele unterschiedliche Protokolle angewendet, die im Folgenden weiter beschrieben werden. Zu Beginn wurden beide PVDF-Membranen in *Tris buffered Saline* (TBS) gewaschen. Im Anschluss daran wurden mittels *RestoreTM PLUS Western Blot Stripping Buffer* die phosphorylierungsspezifischen Antikörper entfernt. Dafür wurden die Titin Gele 30 Minuten mit dem *Restore Buffer* inkubiert. Die Standardgele wurden zur Entfernung der phosphorylierungsspezifischen Antikörper mit dem eigens im Labor hergestellten *Strippingpuffer* für 20 Minuten inkubiert. Zur Herstellung des Strippingpuffers wurde kurz vor

Verwendung β -Mercaptoethanol zur Entfernung der gebundenen Antikörper hinzugegeben. Danach wurden sowohl die Titingele als auch die Standardgele dreimalig mit TBS gewaschen und anschließend mit zweiprozentigem BSA für zwei Stunden blockiert. Im Anschluss an die Blockierung der PVDF-Membran wurde der Gesamt-Antikörper analog zum bereits beschriebenen Protokoll hinzugegeben.

Der Erfolg des *Stripping* Prozesses wurde für jeden phosphorylierungsspezifischen Antikörper einmalig überprüft, indem die PDVF-Membranen, wie oben beschrieben, mit dem Strippingpuffer behandelt und anschließend mit zweiprozentigem BSA blockiert wurden. Allerdings wurde im Anschluss auf die Addition eines primären Antikörpers verzichtet und lediglich der sekundäre Antikörper hinzugegeben. Zur Erfolgskontrolle wurde die so behandelte PVDF-Membran einer Chemolumineszenz Analyse unterzogen.

Außerdem wurden die Perilipine 2 und 5 analysiert, sodass Rückschlüsse auf Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen möglich wurden. Dazu wurde zusätzlich zu den Perilipin- Proteinbanden als Referenz die Proteinbande des α -Aktinin mittels Antikörper angefärbt. Somit konnten die Perilipine ins Verhältnis zum α -Aktinin gesetzt werden, wodurch eine Vergleichbarkeit der relativen Perilipin/ α -Aktinin Verhältnisse ermöglicht wurde.

Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen

Um die Chemolumineszenzsignale der Proteinbanden miteinander zu vergleichen, wurden diese mittels densitometrischer Analyse ausgewertet wozu die Software ImageJ (*National Institutes of Health*,) genutzt wurde. Dabei wurde zum Vergleich ein Quotient aus dem Signal der phosphospezifischen Bande und dem Gesamtsignal der Proteinbande gebildet, womit das Verhältnis des phosphorylierungsspezifischen Signals zum Gesamtsignal berechnet wurde. Um dieses Verhältnis zu normieren, wurde jedem Blot drei Proben der Kontrollgruppe hinzugefügt. Aus diesen drei Proben der Kontrollgruppe wurde ein Mittelwert gebildet, der anschließend zur Normierung aller Quotienten der Phosphorylierungsanalyse des Blots genutzt wurde. Dadurch konnten nach Normierung auch relative Unterschiede angegeben werden. Zudem waren die Membranen der unterschiedlichen Blots besser vergleichbar. Alle verwendeten Proben sind auf wenigstens drei verschiedene *Blots* analysiert worden und aus den erhaltenen Werten wurde im Anschluss der Mittelwert gebildet.

Weiterhin wurden ebenso die Perilipine 2 und 5 im Western Blot untersucht, um mögliche Unterschiede zwischen den Tierversuchsgruppen zu identifizieren. Dazu wurden die Chemolumineszenzsignale der Proteinbanden der Perilipine ebenso mittels densitometrischer Analyse ausgewertet und zur Auswertung ins Verhältnis zu einer Aktinin Bande gesetzt, die ebenso zuvor densitometrisch ausgewertet worden ist. Die Normierung erfolgte im Anschluss daran analog zur phosphorylierungsspezifischen Analyse.

2.2.7 Statistik

Zur Analyse der statistischen Signifikanz wurde das Programm *GraphPad Prism 8* genutzt. Um die statistische Signifikanz der Kraftentwicklung der präparierten M. solei zu überprüfen, wurde für die Werte von PO und sPO ein *One-Way Anova (Analysis of Variance)* Test durchgeführt. Zur Analyse der statistischen Signifikanz der absoluten Fatigue Messung wurde ein *Two-Way Anova* durchgeführt. Die Ergebnisse der Messung wurden auf Signifikanz analysiert. Ebenso erfolgte eine Signifikanzanalyse der prozentualen Mittelwerte der *Fatigue* Messung in Abhängigkeit von der Zeit. Weiterhin wurden auch die Unterschiede im Gewicht, Blutzuckerspiegel sowie der Muskeleinzelgewichte als auch der gemessenen optimalen Muskellänge der Versuchsgruppen einer statistischen Analyse unterzogen. Alle *Anova* wurden mittels *Dunnnett's Test* einem *Multiple Comparisons* in Bezug auf die Kontrollgruppe durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem p Wert von $<0,05$ angenommen. Ergänzend zum *Anova* wurde, sofern nicht anders erwähnt, eine Outlier Analyse durchgeführt.

Die Analyse der relativen Phosphorylierungsanalysen aber auch der Western Blot Ergebnisse sowie der immunhistochemischen Analyse der Muskelschnitte erfolgte ebenso mittels *One-Way Anova* über *Multiple Comparisons (Dunnnett's Test)* in Bezug auf die Kontrollgruppe.

Als Streuungsmaß wird im Fließtext der Standardfehler angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchstiere

Es wurden drei Versuchstiergruppen untersucht, um die Auswirkungen einer Akkumulation von LD in der Skelettmuskulatur bei fettreicher Ernährung in Kombination mit einem diabetischen Mausmodell auf die Muskelfunktion gezielt zu untersuchen. Die Versuchstiergruppe, die *high fat/high sucrose* Futter und STZ-Injektionen erhielt, wird im Folgenden als DIOSTZ-Versuchstiergruppe bezeichnet. Analog dazu wird die Tiergruppe, die STZ-Injektionen und Standardfutter erhielt, als STZ-Tiergruppe bezeichnet.

3.1.1 Gewicht und Blutzuckerwerte der gesamten Stichprobe

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit STZ bei Standardfutter beziehungsweise die STZ-Behandlung in Kombination dem *high fat/ high sucrose* Futter einen Diabetes mellitus induziert haben, wurden bei den Versuchstieren ohne Herzkatheter Untersuchung kurz vor dem Exitus letalis der Blutzucker und das Gewicht ermittelt. Bei den mittels Herzkatheter untersuchten Versuchstieren wurden das Gewicht und der Blutzucker nicht bestimmt.

Gewicht der gesamten Versuchstiergruppe

Bei den Kontrolltieren (n=8) lag das Gesamtgewicht im Mittel bei $29,9 \pm 0,2$ Gramm (g). Im Vergleich dazu wogen die Versuchstiere aus der STZ-Versuchsgruppe (n=8) im Mittel $23,6 \pm 0,5$ g. Somit wogen die Tiere aus der STZ-Versuchsgruppe im Durchschnitt 6,3g weniger als die Versuchstiere ohne die STZ-Behandlung in der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). In der DIOSTZ- Gruppe (n=4) wurde das Gewicht im Durchschnitt mit $27,5\text{g} \pm 0,7\text{g}$ bestimmt (Abb. 16). Die Tiere aus der DIOSTZ- Gruppe waren also im Durchschnitt 2,4g leichter als die Kontrolltiere ($p = 0,007$). Vergleicht man die Versuchstiere der DIOSTZ-Gruppe mit den Tieren der STZ-Gruppe im Hinblick auf ihr Gewicht, sind die STZ-Versuchstiere wiederum leichter (-3,9 g) als die DIOSTZ Versuchstiere.

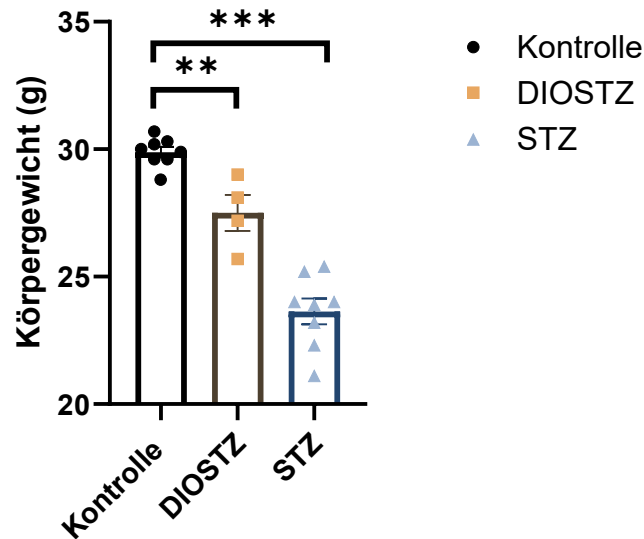


Abb. 16 Darstellung der statistischen Signifikanz der Gewichtsunterschiede in der gesamten Stichprobe zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Gruppe,

Auf der y- Achse ist das Gewicht in Körpergeramm (g) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=8), Streptozotocin und *High fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=4), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=8), die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert des Körpergewichts je Versuchsgruppe $\pm$ die Standardabweichung; Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

Blutzuckerwerte der gesamten Versuchstiergruppe

Vor der Organ- und Muskelentnahme wurde der Blutzucker der Versuchstiere (Abb. 17) gemessen, um zu verifizieren, dass eine diabetische Stoffwechsellaage bei den Versuchstieren der DIOSTZ- und STZ- Versuchsgruppe vorlag. Dabei handelte es sich nicht um Nüchternblutzucker- Werte, da die Mäuse unlimitierten Zugang zu Futter und Wasser hatten. Bei den acht Versuchstieren der Kontrollgruppe konnte ein durchschnittlicher Blutzuckerwert von $171,35 \pm 4,19$ mg/dl gemessen werden, wobei bei den einzelnen Mäusen keine großen individuellen Schwankungen vorlagen. Im Vergleich dazu wurde STZ-behandelten Versuchstieren ein mittlerer Blutzuckerwert von $547 \pm 20,14$ mg/dl gemessen; somit lag der mittlere Blutzucker- Wert der STZ-Tiergruppe gegenüber der Kontrollgruppe um 375,65 mg/dl höher ($p < 0,0001$). Auffällig war hierbei, dass zwei der acht STZ-Tiere einen nicht messbaren Blutzuckerwert aufwiesen, da die obere Messgrenze des Messgeräts überschritten wurde. Die obere Messgrenze des Blutzuckermessgeräts lag bei 600mg/dl, sodass die Blutzuckerwerte folglich höher waren als 600mg/dl, in der Berechnung der Mittelwerte allerdings mit 600mg/dl gewertet worden sind. Daraus folgt, dass der tatsächliche mittlere Blutzuckerwert der STZ-Versuchsgruppe in Wahrheit höher liegen muss als der hier gemittelte. Betrachtet man nun die DIOSTZ Versuchsgruppe, wurde ein mittlerer Blutzuckerwert von $463,8 \pm 27,04$ mg/dl gemessen. Somit ist der Blutzuckerwert der DIOSTZ Tiere niedriger (-83,2 mg/dl) im Vergleich zur STZ-Versuchstiergruppe, aber höher (292,45 mg/dl) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0001$).

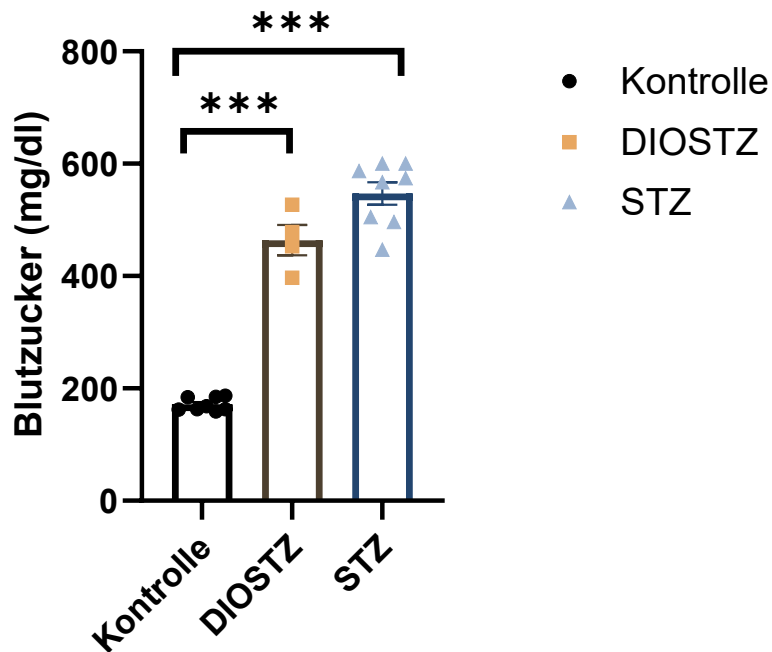


Abb. 17 Darstellung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Blutzuckerwerte in der gesamten Stichprobe zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Gruppe,

Auf der y- Achse ist der Blutzuckerwert in Milligramm/ Deziliter(mg/dl) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=8), Streptozotocin und *High fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ) (n=4), Streptozotocin + Standardfutter (STZ) (n=8), Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der Blutzuckerwerte je Versuchsgruppe $\pm$ die Standardabweichung.; Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

Vergleicht man abschließend Gewicht und Blutzucker der DIOSTZ- und STZ-Gruppe miteinander fällt auf, dass die DIOSTZ behandelten Versuchstiere zwar im Mittel einen geringfügig niedrigeren Blutzucker Wert aufweisen aber im Gegensatz dazu ein höheres Gewicht als die STZ-Gruppe. Vergleicht man alle Gruppen miteinander haben die Kontrolltiere das größte durchschnittliche Gewicht bei dem niedrigsten durchschnittlichen Blutzuckerwert.

3.1.2 Gewicht und Blutzuckerwerte der zur Muskelmessung herangezogenen Subpopulation

Aus Kapazitätsgründen konnten von den acht Tieren aus der Versuchsgruppe ohne Herzkatheter jeweils nur vier Versuchstiere einer Muskelmessung unterzogen werden. Die Auswahl der Versuchstiere für die Muskelmessung erfolgte zufällig.

In der weiteren Auswertung wurde das gemittelte Gewicht und die gemittelten Blutzuckerwerte der gemessenen Subpopulation mit den gemittelten Werten aller Versuchstiere aus der Gruppe ohne Herzkatheter verglichen. Dabei zeigte sich eine identische Gewichtsverteilung verglichen mit der gesamten Stichprobe. Konkret bedeutet dies, dass die jeweils vier Versuchstiere, die zur Muskelmessung verwendet worden sind, in der Kontrollgruppe Subpopulation das höchste Gewicht ($29,9 \pm 0,2g$) und in der STZ-Subpopulation das niedrigste Gewicht ($24,4 \pm 0,5g$) aufwiesen (Abb. 18). Das durchschnittliche

Mausgewicht der vier Versuchstiere aus der DIOSTZ Gruppe, die zur Muskelmessung verwendet worden sind, entsprach dem Gewicht aller Tiere ($27,5 \pm 0,7\text{g}$), da diese Gruppe aus lediglich vier Tieren bestand. Die Mittelwerte der gemessenen Subpopulation im Vergleich zu den Mittelwerten der gesamten Stichprobe wiesen sowohl für die Kontrolltiere ($+0,04\text{g}$) als auch für die STZ-Tiere ($+0,8\text{g}$) eine sehr geringe Differenz auf. Die ermittelten Gewichtsunterschiede zwischen den Tieren der gemessenen Subpopulation ($n=4$) und allen Versuchstieren ($n=8$) waren damit für jede Behandlungsgruppe nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Schlussfolgernd ist die gemessene Stichprobe in Bezug auf das Gewicht repräsentativ für die Gesamtpopulation mit $n=8$.

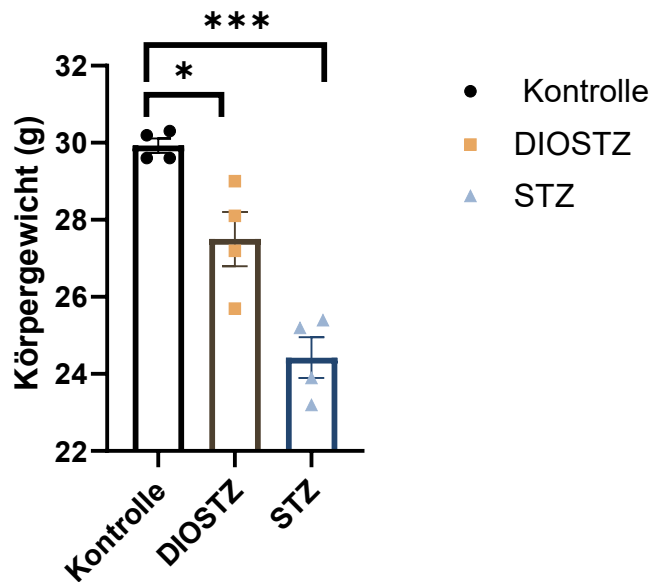


Abb. 18 Darstellung der statistischen Signifikanz der Gewichtsunterschiede in der gemessenen Subpopulation zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Mäusen

Auf der y- Achse ist das Körpergewicht in Gramm (g) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, $n=4$), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, $n=4$), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, $n=4$). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert des Mausgewichts je Versuchsgruppe $\pm$ die Standardabweichung; Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

Blutzuckerwerte der zur Muskelmessung herangezogenen Subpopulation

Auch für die Blutzuckerwerte der herangezogenen zur Muskelmessung herangezogenen Subpopulation ergab sich im Vergleich zur gesamten Stichprobe aller Versuchstiere eine identische Verteilung der gemittelten Blutzuckertwerte. Dabei ergab sich für die Kontrolltiere der Subpopulation der niedrigste gemittelte Blutzuckerwert ($175,75 \pm 6,02 \text{ mg/dl}$) und im Gegensatz dazu für die STZ- Versuchstiere der gemessenen Subpopulation der höchste mittlere Blutzuckerwert ($569,8 \pm 22,44 \text{ mg/dl}$) (Abb.19). Auffällig war ein höherer durchschnittliche Blutzuckerwert in der STZ-Subpopulation ($+22,8 \text{ mg/dl}$) im Vergleich zur gesamten STZ-Stichprobe. Dies wurde am ehesten durch den nicht messbar hohen Blutzuckerwert (gewertet mit 600mg/dl) von den bereits benannten zwei STZ-Versuchstieren erklärt, die beide einer Muskelmessung zugeführt worden sind und damit den Blutzuckerwert der Subpopulation fälschlicherweise höher erscheinen ließen. Für die Blutzuckerwerte der Kontrollgruppen Subpopulation ergab sich eine sehr geringe Differenz ($+4,38 \text{ mg/dl}$) der Mittelwerte im Vergleich zur gesamten Stichprobe. Die DIOSTZ Subpopulation entspricht der gesamten DIOSTZ Stichprobe, sodass die DIOSTZ Tiere einen höheren Blutzuckerwert ($463,8 \pm 27,04 \text{ mg/dl}$) als die Kontrolltiere aus der Subpopulation

aber einen geringeren als die STZ-Versuchstiere aus der gemessenen Subpopulation aufwiesen. Insgesamt entspricht die Verteilung der Blutzuckerwerte in der gemessenen Subpopulation der der Gesamtpopulation. Auch in der statistischen Analyse ergaben sich zwischen der gesamten Stichprobe und der zur Muskelmessung herangezogenen Subpopulation keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Daher wurde die gemessene Subpopulation als repräsentativ gewertet.

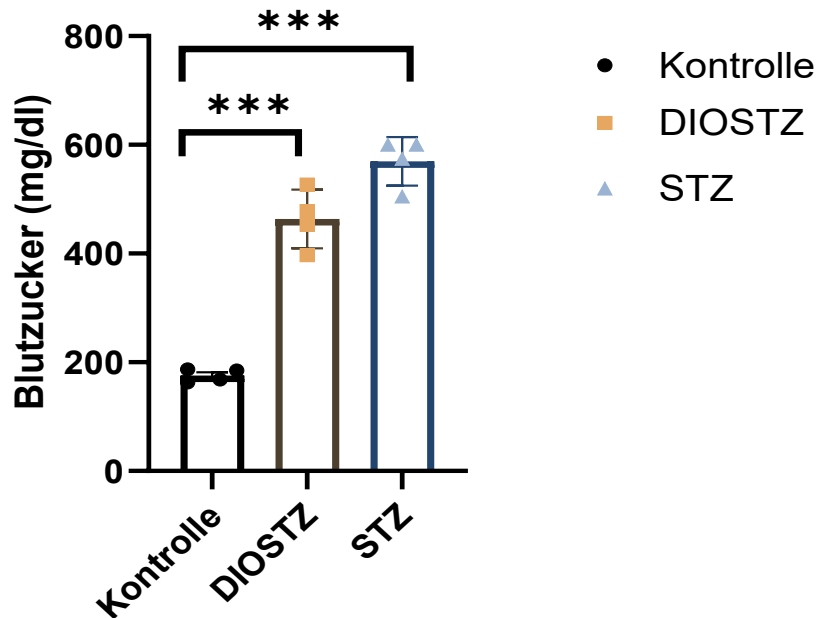


Abb. 19 Darstellung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Blutzuckerwerte in der gemessenen Subpopulation zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Mäusen

Auf der y- Achse ist der Blutzuckerwert in Milligramm/ Deziliter(mg/dl) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=4), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=4), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=4), Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der Blutzuckerwerte je Versuchsgruppe $\pm$ die Standardabweichung, Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

3.1.3 Optimale Länge und Gewicht der Muskelpräparate

Zur Berechnung der spezifischen Kraft im Nachgang zur Muskelmessung wurden sowohl die optimale Länge als auch das Gewicht der Muskelpräparate aus der Stichprobe erfasst. Bei der Auswertung der erhobenen Werte wurden diese gemittelt, sofern es sich um die beiden M. solei eines Versuchstieres handelte. Es wurden die identischen Ausschlusskriterien analog zur Kraftmessung angewendet.

Die M. solei der Kontrollgruppe (n=5) waren im Mittel $9,31 \pm 0,36$ mm lang (Abb. 20). Im Vergleich dazu waren die M. solei der DIOSTZ- Versuchsgruppe (n=7) im Mittel mit $10,13 \pm 0,08$ mm um 0,82 mm signifikant länger ($p=0,029$). Die M. solei aus der STZ-Versuchsgruppe (n=9) waren im Durchschnitt $9,67 \pm 0,17$ mm lang und damit länger (+0,36 mm) als die Muskeln aus der Kontrollgruppe ($p= 0,37$). Die optimale Länge der Muskelpräparate der STZ- Tiere war im Vergleich mit der DIOSTZ Tiergruppe kürzer (-0,46 mm).

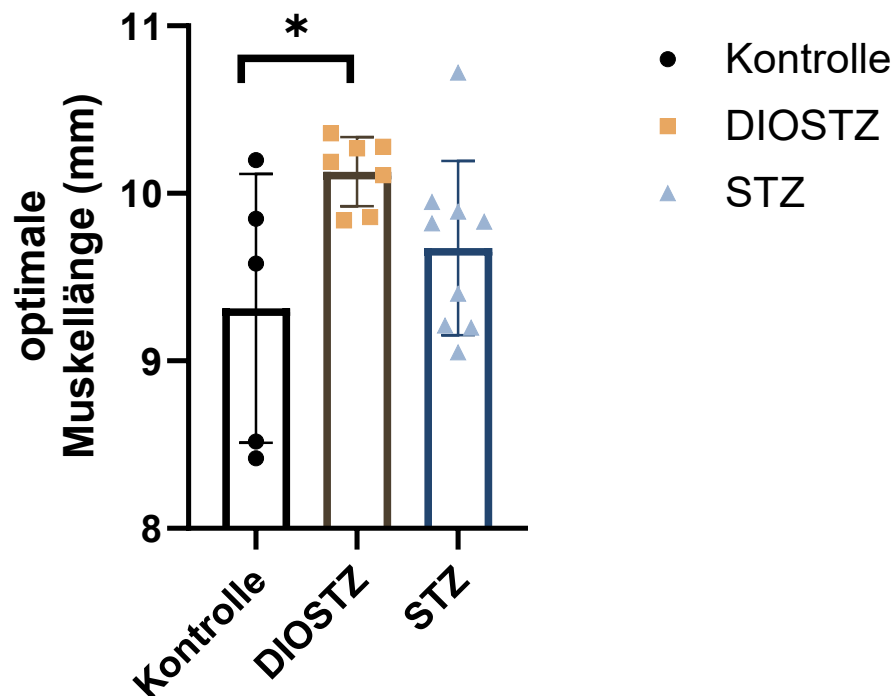


Abb. 20 Auswertung der Unterschiede in der optimalen Muskellänge der präparierten *M. solei*

Auf der y- Achse ist die gemessene optimale Länge des Muskelpräparates in Millimeter (mm) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=5), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=7), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=9). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der optimalen Länge je Versuchsgruppe ± die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

Muskeleinzelgewichte der entnommenen *M. solei*

Weiterhin wurden nach der Muskelmessung auch die Muskeleinzelgewichte der Muskelpräparate gemessen und analysiert. Dabei wies die Kontrollgruppe ein gemitteltes Gewicht von $9,84 \text{ mg} \pm 0,89 \text{ mg}$ auf. Im Vergleich dazu war die DIOSTZ- Versuchsgruppe ($10,69 \text{ mg} \pm 0,58 \text{ mg}$) um $0,85 \text{ mg}$ ($p=0,57$) schwerer, die STZ- Versuchsgruppe ($8,89 \text{ mg} \pm 0,50 \text{ mg}$) hingegen war um $0,95 \text{ mg}$ ($p=0,50$) leichter im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vergleicht man die DIOSTZ- Versuchsgruppe mit der STZ- Versuchsgruppe waren die STZ-Versuchstiere $1,80 \text{ mg}$ leichter (Abb. 21)

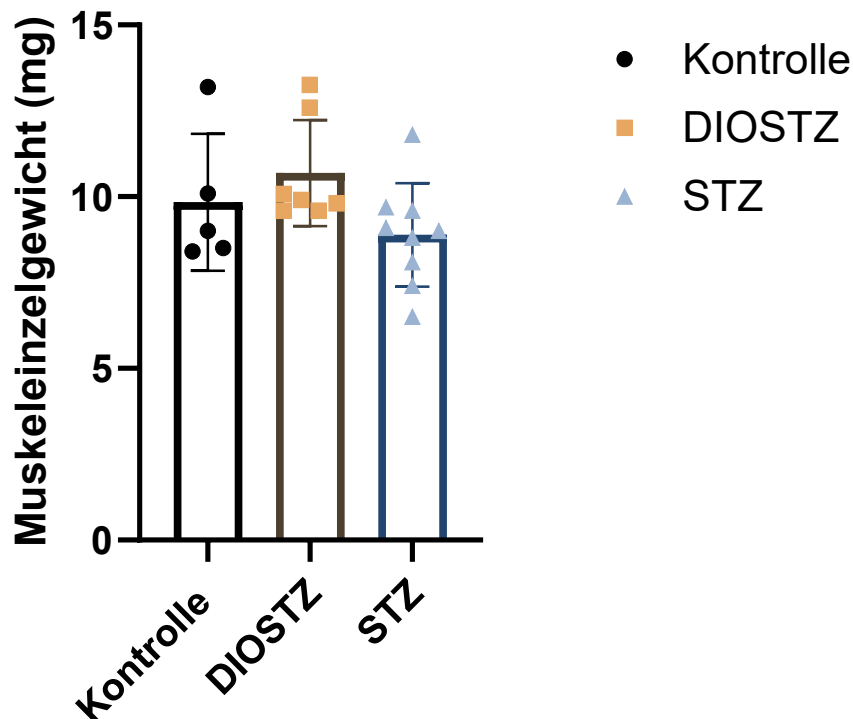


Abb. 21 Analyse der Gewichtsunterschiede der Muskeleinzelgewichte

Auf der y- Achse ist das Muskeleinzelgewicht des Muskelpräparates in Milligramm (mg) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=5), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=7), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=9). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der Muskeleinzelgewichte ± die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die optimale Länge der Muskelpräparate aus der DIOSTZ Versuchstiere länger, aber die Muskelpräparate auch schwerer als die der anderen beiden Versuchsgruppen waren. Die STZ-Versuchstiere wiesen im Vergleich zu den anderen Gruppen die leichtesten *M. solei* auf. Die Muskulatur der Kontrollgruppe war durchschnittlich im Vergleich mit den anderen Gruppen, bezogen auf die optimale Muskellänge, die kürzeste, jedoch bezogen auf das Muskeleinzelgewicht nicht die leichteste. Zusätzlich fällt auf, dass die Muskelpräparate aus der STZ- Versuchsgruppe bezogen auf die optimale Länge zwar länger als die Präparate aus der Kontrollgruppe waren, aber im Mittel leichter.

Die optimale Länge der Muskelpräparate schwankte in der Kontrollgruppe zwischen 8,42mm und 10,2 mm, in der DIOSTZ- Versuchsgruppe zwischen 9,84 mm und 10,36 mm sowie in der STZ- Versuchsgruppe zwischen 9,05 mm und 10,72mm. Das Gewicht der Muskelpräparate schwankte in der Kontrollgruppe zwischen 8,40mg und 13,2 mg, in der DIOSTZ- Versuchsgruppe zwischen 9,6mg und 13,25mg sowie in der STZ- Versuchsgruppe zwischen 6,5mg und 11,8 mg.

Korrelation des Muskeleinzuggewichts mit dem Körpergewicht:

Da statistisch signifikante Unterschiede im durchschnittlichen Körpergewicht der drei Tiergruppen festgestellt worden sind, wurden die Muskeleinzuggewichte zur besseren Vergleichbarkeit mit dem durchschnittlichen Körpergewicht der Versuchsgruppe korreliert. Dazu wurde ein Koeffizient aus Muskeleinzuggewicht und Mausgewicht gebildet (Abb.22). In der Kontrollgruppe brachten die Tiere im Vergleich das höchste Körpergewicht (29,9g) auf die Waage, jedoch war das Muskeleinzuggewicht (9,84 mg) der Kontrollgruppe nicht das höchste im Vergleich mit den anderen Gruppen, sodass eine Korrelation der beiden Gewichte sinnvoll erschien. Damit ergab sich der Koeffizient von Muskelgewicht zu Körpergewicht von 0,29 mg/g in der Kontrollgruppe. Auffällig war vor allem der Unterschied zu den Tieren der STZ- Gruppe. Die STZ behandelten Mäuse waren die leichtesten (24,43g), hingegen wiesen diese in Relation schwere M. solei (8,89mg) auf, sodass sich ein Koeffizient von 0,39mg/g ergab. Damit hatten die M. solei der STZ-Tiere einen höheren Anteil am Körpergewicht der Maus. In der statistischen Analyse mittels *One Way ANOVA* erwies sich dieser Unterschied mit $p=0,01$ als signifikant. In der DIOSSTZ Versuchsgruppe wogen die Mäuse im Durchschnitt 27,5 g und der M. soleus im Schnitt mit 10,69mg am meisten im Vergleich zu den anderen Tiergruppen, was ein Koeffizient von 0,35 ergab. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch nicht signifikant. In der deskriptiven Statistik ergaben sich durchweg geringe Standardfehler. (Kontrolle: 0,02 mg/g, DIOSSTZ: 0,003 mg/g; STZ: 0,03mg/g)

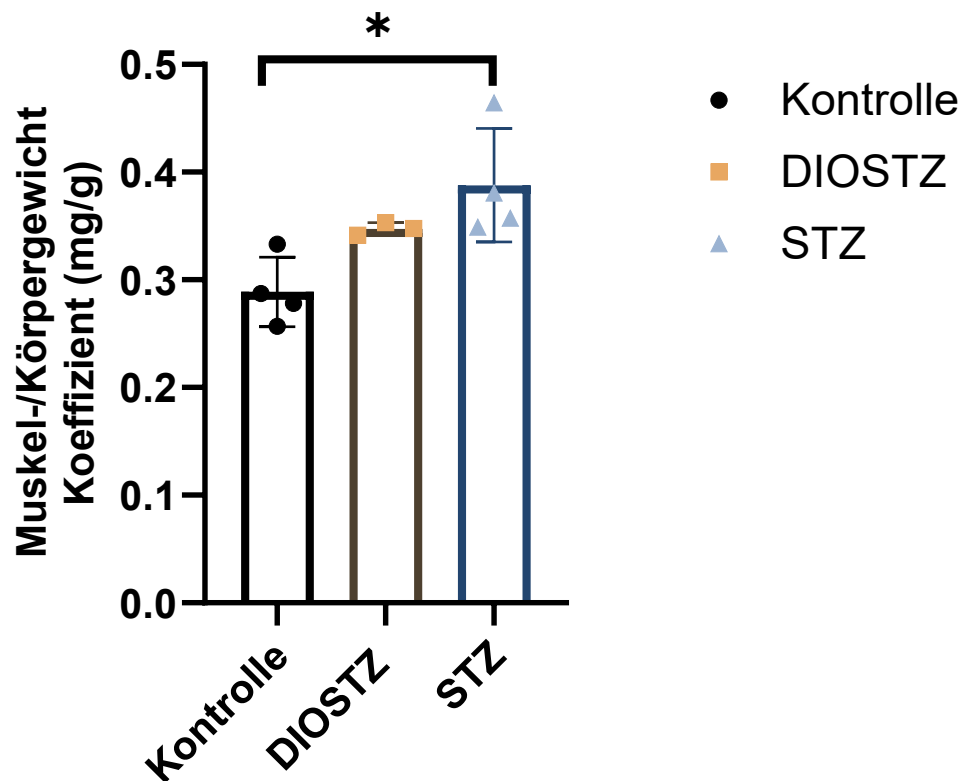


Abb. 22 Analyse des Verhältnisses von Muskeleinzelgewicht zu Körpergewicht zwischen den Versuchsgruppen

Auf der y- Achse ist der Koeffizient von Muskeleinzelgewicht in Milligramm (mg) zu Körpergewicht in Gramm (g) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrollen=4), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=3), Streptozotocin + Standardfutter (STZ n=4). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der Koeffizienten $\pm$ die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

3.2 Ergebnisse der Kraftmessung

Um zu untersuchen inwieweit die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere sowie die Behandlung mit STZ als Mausmodell für Diabetes Mellitus einen Einfluss auf die Muskelkraft der Versuchsgruppen hatten, wurden die Versuchstiere einer Kraftmessung unterzogen. Dabei galten für die Auswertung die bereits bekannten Ausschlusskriterien, sodass die Stichprobe der Kontrollgruppe aus fünf Tieren, die Stichprobe der DIOSTZ Versuchsgruppe aus sieben Versuchstieren und Stichprobe der STZ-Versuchsgruppe aus neun Versuchstieren bestand. Die fünf Versuchstiere aus der Kontrollgruppen Stichprobe bestanden aus drei Versuchstieren ohne vorheriger Herzkatheter Untersuchung und aus zwei Versuchstieren mit vorher durchgeführter Herzkatheter Untersuchung. Die DIOSTZ Stichprobe bestand aus vier Versuchstieren ohne Herzkatheter Untersuchung und drei Versuchstieren mit vorheriger Herzkatheter Untersuchung. Die STZ-Stichprobe bestand insgesamt aus neun Versuchstieren, die sich aus vier Versuchstieren ohne und fünf Versuchstieren mit Herzkatheter Untersuchung zusammensetzte. Es folgt nun die Darstellung der gemessenen maximalen isometrischen tetanischen Kraftwerte (PO) sowie der auf die Muskelquerschnittsfläche normierten spezifischen Kraftwerte (sPO).

3.2.1 Auswertung der Kraftmessung in der Kontrollgruppen Stichprobe

PO- Werte der Kontrollgruppen Stichprobe

Um die Ergebnisse der Kraftmessung in den verschiedenen Behandlungsgruppen beurteilen und einordnen zu können, diente die Kontrollgruppe als Referenzgruppe für den Vergleich mit der DIOSTZ- und STZ-Stichprobe und wurde daher analog zu den beiden Behandlungsgruppen ausgewertet. In der Kontrollgruppen-Stichprobe lag der Mittelwert der PO bei $67,97\text{mN} \pm 15,26\text{ mN}$ (Abb.23). Der Standardfehler suggeriert eine große Streuung der Einzelwerte. Die gemessenen Werte schwankten um $83,13\text{mN}$ zwischen dem Minimum von $37,07\text{mN}$ und dem Maximum von $120,2\text{mN}$, die beide von Tieren aus der Population ohne Herzkatheter Untersuchung erreicht worden sind. Damit war die Streuung der gemessenen PO- Werte in der Kontrollgruppe groß.

sPO- Werte der Kontrollgruppen Stichprobe

Nach Normierung auf die Muskelquerschnittsfläche ergab sich ein gemittelter sPO-Wert von $48,54\text{ mN/mm}^2$ mit einem Standardfehler von $\pm 11,2\text{ mN/mm}^2$, sodass auch hier die Streuung insgesamt recht groß war. Das Minimum der sPO lag bei $28,01\text{ mN/mm}^2$, das Maximum bei $88,58\text{ mN/mm}^2$, was eine Spannbreite von $60,57\text{ mN/mm}^2$ ergibt, die damit um $22,56\text{ mN/mm}^2$ reduziert war im Vergleich zur Spanne der PO- Werte.

In der Zusammenschau lässt sich vergleichend festhalten, dass sich der sPO-Wert immer kleiner errechnete als der jeweilige PO- Wert (Abb. 23). Ebenso erwies sich sowohl der Standardfehler als auch die Spannbreite zwischen Minimum und Maximum der sPO- im Vergleich zu den PO- Werten als kleiner. Die Abbildung 23 zeigt weiterhin, dass sowohl die gemessenen PO- als auch die errechneten sPO- Werte im Vergleich der einzelnen Tiere innerhalb der Kontrollgruppe schwankend waren. Zudem lässt sich feststellen, dass die sPO-Werte bei den Tieren mit sehr hohen PO- Werten deutlich geringer ausfallen als bei den anderen Versuchstieren.

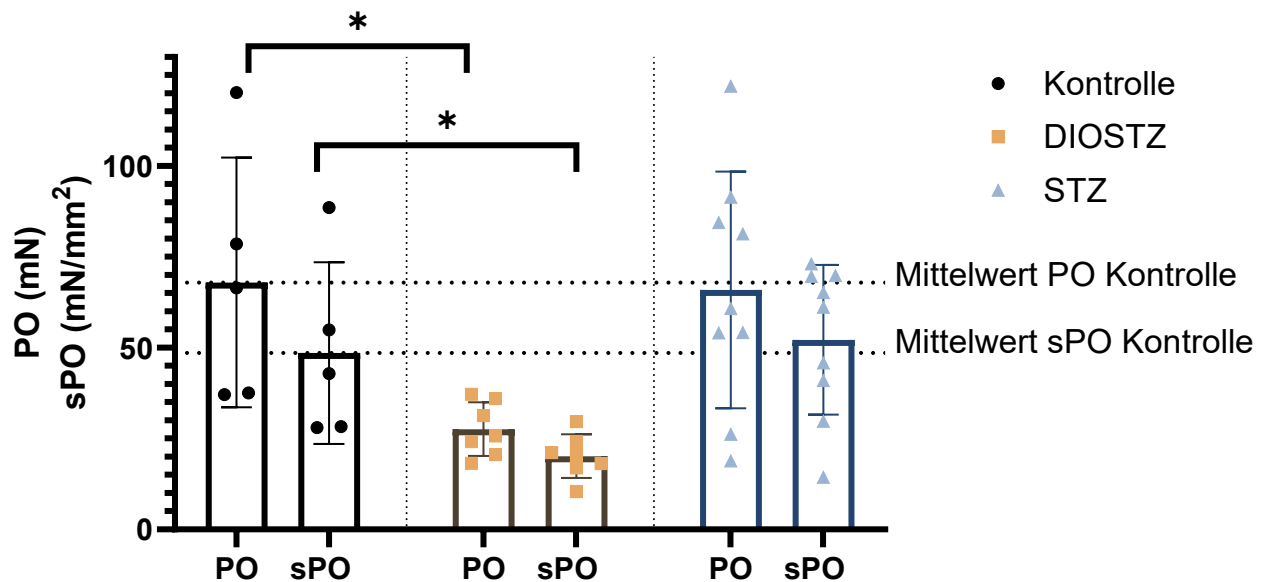


Abb. 23 Darstellung der Kraftmessung (PO und sPO) der Versuchsgruppen im direkten Vergleich

Auf der y-Achse ist die Kraft in Millinewton (mN) beziehungsweise in Millinewton pro Quadratmillimeter (mN/mm²) aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=5), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=7), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=9). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der PO- sowie der sPO- Kraftwerte $\pm$ die Standardabweichung.

PO= gemessene maximale isometrische tetanische Kraft des Muskelpräparates, sPO= auf den Muskelquerschnitt normierte PO, Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

3.2.2 Auswertung der Kraftmessung in der DIOSTZ- Stichprobe

PO- Werte in der DIOSTZ Stichprobe

Um die Auswirkungen der Behandlung mit STZ in Kombination mit dem *high fat/high sucrose* Futter auf die Muskelkraft zu untersuchen, wurden die Tiere aus der DIOSTZ- Stichprobe ebenso einer Kraftmessung unterzogen. Der gemittelte PO- Wert in der DIOSTZ Stichprobe lag bei $27,67 \pm 2,80$ mN (Abb.23). Es ist hervorzuheben, dass sich der Standardfehler im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich geringer errechnet. Bei Betrachtung der Abb. 23 fällt im Vergleich mit den anderen Tiergruppen sofort die geringere Streuung bei den DIOSTZ Tieren auf. Zwischen dem minimalen PO- Wert von 18,2 mN und dem maximalen Wert von 37,17 mN lag eine Differenz von lediglich 18,97mN, was also deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe. Die geringere Streuung der Kraftwerte in der DIOSTZ-Versuchsgruppe im Vergleich zur STZ- und Kontrollgruppe kann als Beleg für den Einfluss der STZ- Behandlung in Kombination mit dem *high fat/high sucrose* Futter auf die Muskelkraft der Versuchstiere interpretiert werden.

sPO-Werte der DIOSTZ- Stichprobe

Nach Berechnung der sPO- Werte ergab sich ein Mittelwert von $20,15 \pm 2,27 \text{ mN/mm}^2$ (Abb. 23) für die DIOSTZ Stichprobe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren der Standardfehler als auch die Spannweite ($19,23 \text{ mN/mm}^2$) der Werte deutlich niedriger, was den potenziellen Einfluss der STZ-Behandlung in Kombination mit dem *high fat/ high sucrose* Futter hervorhebt. Aus Abbildung 23 geht neben einer vergleichsweise geringen Streuung hervor, dass diese Versuchsgruppe annähernd homogene sPO-Werte aufwies.

Abschließend lässt sich im Vergleich der PO- und sPO- Werte auch in der DIOSTZ Gruppe feststellen, dass die sPO- Werte immer geringer waren als die PO-Werte (Abb. 23). In der deskriptiven Statistik wurde deutlich, dass, obwohl die sPO-Werte niedriger lagen als die PO-Werte, die Spannweite der Werte sowohl bei den PO-Werten als auch bei den sPO-Werten nahezu identisch war ($18,97 \text{ mN}$ zu $19,23 \text{ mN/mm}^2$). Abschließend lässt sich also festhalten, dass sowohl die PO- als auch die sPO-Werte eine geringe Schwankung zeigten.

3.2.3 Auswertung der Kraftmessung in der STZ- Stichprobe

PO-Werte in der STZ- Stichprobe

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede zwischen der DIOSTZ- Stichprobe und der Kontrollgruppen Stichprobe potenziell auf das *high fat/ high sucrose* oder die Behandlung mit STZ zurückzuführen sind, wurde auch bei der STZ- Stichprobe eine Kraftmessung durchgeführt. In der STZ- Stichprobe ergab sich für die PO ein Mittelwert von $65,91 \pm 10,84 \text{ mN}$ (Abb. 23). Insgesamt wurde bei den neun Versuchstieren ein Minimum von $18,83 \text{ mN}$ gemessen, dass einem Maximum von $121,94 \text{ mN}$ gegenübersteht. Damit haben die Messergebnisse eine sehr große Streuung ($103,07 \text{ mN}$). Die große Streuung wird vor allem durch zwei STZ-Versuchstiere verursacht, bei denen das Minimum ($18,83 \text{ mN}$) beziehungsweise das Maximum ($121,94 \text{ mN}$) der PO gemessen worden ist.

sPO- Werte der STZ- Stichprobe

Aus der Berechnung der sPO-Werte ergab sich ein durchschnittlicher sPO- Wert von $52,20 \pm 6,87 \text{ mN/mm}^2$, der damit $13,71 \text{ mN}$ kleiner ist als der gemittelte PO- Wert (Abb. 23). Der Standardfehler errechnete sich bei den sPO- Werten niedriger im Vergleich zu den PO- Werten. Das sPO-Minimum errechnete sich mit $14,33 \text{ mN/mm}^2$, das Maximum mit $73,11 \text{ mN/mm}^2$. Die Spannweite war mit $58,78 \text{ mN/mm}^2$ deutlich geringer als noch bei den gemessenen PO- Werten ($103,11 \text{ mN}$). Durch die Normierung wurde also die große Streuung in der PO- Gruppe relativiert. Insgesamt waren auch hier die normierten sPO-Werte im direkten Vergleich zu den PO- Werten zumeist kleiner.

3.2.4 Vergleich der Kontrollgruppen-, DIOSTZ- und STZ- Stichprobe

Um die Einflüsse der verschiedenen Behandlungsprotokolle auf die Muskelkraft der Versuchstiere zu untersuchen und potenzielle Einflussfaktoren zu identifizieren, wurden die gemessenen und normierten Kraftwerte der drei Versuchsgruppen miteinander verglichen sowie statistisch analysiert. Es fielen zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen auf (Abb 23). Auffällig sind die deutlich geringeren sPO- als auch PO - Werte der DIOSTZ-Population im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen. Ebenso fällt auf, dass die Kontrollgruppe und die STZ- Stichprobe nahezu identische sPO- und PO- Werte aufwiesen.

Der gemittelte PO- Wert in der DIOSTZ Stichprobe lag bei $27,67 \pm 2,80$ mN und damit deutlich niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppen Stichprobe ($p=0,04$). Die Differenz zwischen den PO -Werten der DIOSTZ- und der Kontrollgruppe aber auch der STZ-Stichprobe war mit 40,36mN und 38,3 mN sehr groß. Im Vergleich der Kontrollgruppe mit der STZ- Stichprobe lagen die PO- Werte der Kontrollgruppe um 2,06 mN höher ($p=0,99$). Daraus ergibt sich in Anbetracht der absoluten Höhe der Werte, dass die gemessenen maximalen isometrischen tetanischen Kraftwerte der STZ- und Kontrollgruppen-Subpopulation auf einem vergleichbaren Niveau lagen und es keinen großen Unterschied in den beiden Behandlungsgruppen gab. Jedoch weist die große Differenz der Kraftwerte zwischen der DIOSTZ-Behandlungsgruppe und den anderen beiden Behandlungsgruppen auf eine signifikant verringerte Muskelkraft bedingt durch die DIOSTZ Behandlung hin. Weiterhin kann man schlussfolgern, dass die Unterschiede in der Muskelkraft möglicherweise durch die Fettfütterung bedingt waren oder aber erst die Kombination aus dem *high fat/ high sucrose* Futter mit der STZ-Behandlung zu einer Beeinträchtigung der Muskelkraft führte.

Vergleicht man zusätzlich die sPO- Werte untereinander, ergab sich eine ähnliche Konstellation, was wiederum die obige Schlussfolgerung unterstützt. Es gibt deutliche Unterschiede in den sPO-Werten zwischen der DIOSTZ- Versuchsgruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. So ergibt sich zwischen STZ- und Kontrollgruppe eine Differenz der Mittelwerte von lediglich $3,66 \text{ mN/mm}^2$ ($p= 0,91$), wobei auffällt, dass der ermittelte sPO – Wert in der STZ-Gruppe, anders als bei den PO- Werten in der STZ-Gruppe, höher lag als in der Kontrollgruppe. Im Unterschied dazu lagen die sPO-Werte der DIOSTZ-Tiergruppe mit $28,39 \text{ mN/mm}^2$ im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p= 0,03$) und mit $32,05 \text{ mN/mm}^2$ im Vergleich zur STZ- Tiergruppe deutlich niedriger. Dies suggeriert, dass auch die normierten sPO-Werte einen Unterschied zeigen, der daraufhin deutete, dass das *high fat/ high sucrose* Futter entweder allein oder aber in Kombination mit der STZ-Behandlung zu einer deutlichen Abnahme der Muskelkraft führte. Die Normierung auf die Muskelquerschnittsfläche war in diesem Zusammenhang bedeutsam, da die Muskelpräparate der DIOSTZ Tiere, wie bereits beschrieben, länger und schwerer waren als die Präparate der Vergleichsgruppen.

Besonders deutlich werden die Unterschiede der gemessenen Muskelkraft in den jeweiligen Versuchsgruppen nach prozentualer Darstellung in Bezug auf die Kontrollgruppe. Durch die DIOSTZ Behandlung kommt es zu einer deutlichen Abnahme der tetanischen Muskelkraft im Vergleich zur Kontrollgruppe, aber auch zur STZ- Tiergruppe. Drückt man dies prozentual in Bezug zur Kontrollgruppe aus (Abb. 24) nimmt die PO um 59,38% und die sPO um 58,48% in der DIOSTZ Behandlungsgruppe ab.

Ebenso zeigte sich, dass die Kontrollgruppe und die STZ- Stichprobe nahezu identische sPO- und PO- Werte aufwiesen. Aus Abb. 24 wird weiterhin deutlich, dass zwischen den Versuchstieren der STZ- Gruppe und der Kontrollgruppe, bezogen auf die gemessenen PO-Werte, prozentual lediglich ein geringer Unterschied von 3,04% bestand.

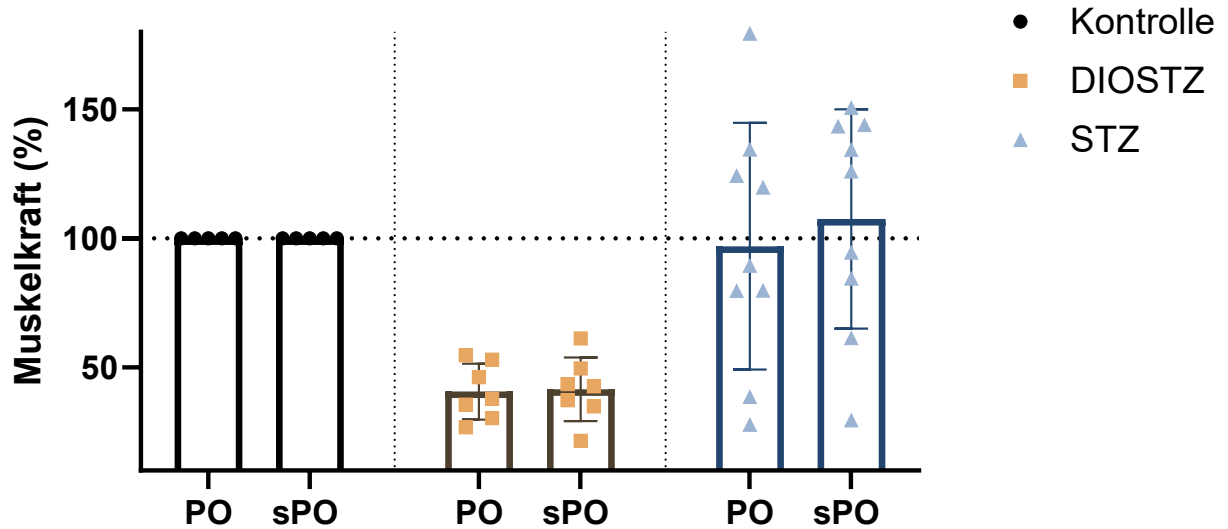


Abb. 24 prozentuale Darstellung der PO und sPO im Vergleich der drei Behandlungsgruppen

Auf der y-Achse ist die relative Kraft in Bezug auf die Kontrollgruppe in Prozent (%) aufgetragen, auf der x-Achse sind die PO und sPO-Werte je Versuchstiergruppe aufgetragen. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Mittelwert der PO- und sPO-Kraftwerte. In der Kontrollgruppe wurden 5 Mäuse untersucht, in der DIOSTZ (STZ+ *high fat/high sucrose* Futter) Gruppe wurden 7 Mäuse untersucht, in der Streptozotizin (STZ)-Gruppe wurden 9 Mäuse untersucht; PO= gemessene maximale isometrische tetanische Kraft des Muskelpräparates, sPO= errechnete spezifische Kraft des Muskelpräparates

Die Hypothese, dass entweder das *high fat/ high sucrose* Futter allein oder die Kombination mit der STZ-Behandlung zu einer Abnahme der Muskelkraft führt, wird durch die deutlich geringere Schwankung der Kraftwerte der PO und sPO-Werte in der DIOSTZ Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur STZ-Behandlungsgruppe unterstützt. In Abbildung 23 wird die Streuung der PO- Werte der einzelnen Versuchstiere deutlich. Dabei lag die Spanne zwischen Minimum und Maximum der PO- Werte in der Kontrollgruppe bei 83,13 mN, in der STZ- Behandlungsgruppe lag diese Spanne sogar noch höher bei 103,07mN, wohingegen die *Range* zwischen Minimum und Maximum in der DIOSTZ-Behandlungsgruppe lediglich 18,97 mN betrug. Ebenso zeigt Abbildung 23 deutlich, dass der Standardfehler in der DIOSTZ Stichprobe deutlich geringer war als in den anderen beiden Versuchsgruppen.

In Abbildung 23 wurde auch die Streuung der sPO-Werte dargestellt. Hier konnte ein ähnlicher Zusammenhang wie bei den PO- Werten beobachtet werden. Auch hier war die Streuung der sPO-Werte in der DIOSTZ Gruppe mit einer Spanne von 19,23 mN/mm² deutlich geringer als in der STZ-Versuchsgruppe (58,78 mN/mm²) oder der Kontrollgruppe (60,57 mN/mm²). Obwohl die Streuung der sPO-Werte in der STZ- und Kontrollgruppe im Vergleich zur Streuung der PO – Werte in den jeweiligen Gruppen insgesamt kleiner war, ist der Unterschied zur Streuung in der DIOSTZ Stichprobe immer noch deutlich. Nach statistischer Auswertung konnte festgestellt werden, dass die Unterschiede der sPO- Werte, zwischen der DIOSTZ- und der Kontrollgruppe mit einem p- Wert von 0,03 signifikant waren, die Unterschiede zwischen der STZ- und Kontrollgruppe mit einem p- Wert von 0,91 jedoch nicht signifikant waren.

3.3 Ergebnisse der Ermüdungsmessung

Da es in der Literatur Hinweise auf eine Veränderung der Myosin-Isoformen bei fettreicher Ernährung [86] sowie einer Akkumulation des intramuskulären Fettes bei Diabetes Mellitus aber auch fettreicher Ernährung [86] gibt, wurde zur Überprüfung der metabolischen Auswirkungen der Diabetes Mellitus Modellerkrankung sowie der Fütterung mit *high fat/ high sucrose* Futter auf die Muskelermüdung eine Ermüdungs- Messung der entnommenen Muskulatur durchgeführt. Dazu wurden die Muskelpräparate repetitiv über 30 Minuten stimuliert und die Muskelantwort kontinuierlich erfasst und aufgezeichnet. Die erfassten Kraftwerte der Muskelpräparate wurden im Anschluss ins Verhältnis zur initialen Kraftantwort der ersten Stimulation gesetzt und durch die Darstellung der absoluten Werte ergänzt. Es wurden zur Auswertung die gleichen Ausschlusskriterien angewendet wie bereits bei der Kraftmessung.

Fatigue Messung	MW-Kontrollgruppe	MW DIOSTZ- Versuchsgruppe	MW STZ- Versuchsgruppe
Start	100,00%	100,00%	100,00%
3 Minuten	35,23 ± 2,70 %	44,96 ± 8,21 %	54,45 ± 3,83 %
6Minuten	19,11 ± 1,34 %	37,46 ± 9,64 %	35,72 ± 4,21 %
9 Minuten	15,95 ± 1,55 %	33,74 ± 9,80 %	32,02 ± 4,22 %
12 Minuten	14,53 ± 1,95 %	32,15 ± 9,48 %	30,86 ± 4,29 %
15 Minuten	14,24 ± 2,18 %	31,31 ± 9,49 %	32,58 ± 4,72 %
18 Minuten	14,18 ± 2,56 %	39,48 ± 8,93 %	33,14 ± 5,32 %
21Minuten	14,35 ± 2,42 %	29,04 ± 8,34 %	33,46 ± 5,47 %
24 Minuten	14,71 ± 2,51 %	29,26 ± 8,47 %	33,94 ± 5,80 %
27 Minuten	14,76 ± 2,56 %	28,64 ± 8,35 %	34,63 ± 6,30 %
30 Minuten	14,87 ± 2,67 %	28,37 ± 8,31 %	35,38 ± 6,41 %

Tabelle 11 prozentuale Mittelwerte der Ermüdungsmessung,
tabellarisch dargestellt wurden die gemittelte prozentuale Kraftantwort im Vergleich zur initialen Kraftantwort mit Standardfehler, MW= Mittelwert,

In Tabelle 11 sind die prozentualen Mittelwerte der Ermüdungsmessung inklusive Standardfehler dargestellt. Die Ermüdung wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt.

Nach dem Start bei 100% fällt auf, dass nach drei Minuten in allen Gruppen die Kraftantwort deutlich abnahm, am stärksten in der Kontrollgruppe, und zwar um 64,73%. Dieser Trend setzt sich in der Kontrollgruppe mit einer im Verhältnis zu den anderen Versuchsgruppen stärkeren Ermüdungsreaktion und einem starken Abfall der Kraftantwort über die Zeit fort, bis in Minute 12 die Ermüdung mit einem Prozentwert von 14,53% erreicht worden ist. Im Anschluss blieb der prozentuale Kraftwert in der Kontrollgruppe auf einem nahezu konstanten Niveau im Bereich von 14% - 15%.

Anders verhält es sich in der DIOSTZ Versuchsgruppe, in der die Ermüdungsreaktion, verglichen mit der Kontrollgruppe, nicht so stark ausgefallen ist. Nach einem zu Beginn recht starken Abfall der erfassten Kraftantwort kam es zu einer schwächeren Abnahme der Kraftantwort. So bewegte sich die prozentuale Kraft in dieser Versuchsgruppe zwischen der sechsten und 15 Minute in einem Bereich zwischen 30% bis knapp 38%. Der im Vergleich zur Kontrollgruppe langsamere Abfall der Kraftantwort setzte sich bis zu einem Tiefstwert von 28,37 % in Minute 30 fort, die hier definierte 15% Ermüdungsmarke wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt unterschritten. Ein ähnlicher Verlauf konnte in der STZ- Versuchsgruppe beobachtet werden. Nach einem initialen Abfall der Kraft um 45,55% auf 54,45% des Ausgangswertes, verlangsamte

sich auch hier die Reduktion der Kraftantwort bis in der 12. Minute mit 30,86% der niedrigste Wert gemessen wurde. Zwischen der sechsten und der 30. Minute bewegte sich die prozentuale Kraftantwort auf einem Plateau zwischen 30% und 36%, sodass auch in der STZ-Gruppe die 15% Ermüdungsgrenze nicht unterschritten wurde. Im Vergleich zur DIOSTZ Versuchsgruppe liegt der niedrigste erfasste prozentuale Kraftwert in der STZ- Tiergruppe um 2,22% höher. Abschließend lässt sich in allen Versuchsgruppen ab Minute 24 beziehungsweise 27 ein leicht ansteigender Trend beobachten, sodass die gemessenen Kraftwerte in geringem Umfang gegen Ende der Messung angestiegen sind.

In Abbildung 25 ist der Verlauf der Kraftmessung graphisch dargestellt. Hier lässt sich schön erkennen, wie es zu Beginn zu einer starken und in allen Gruppen vergleichbaren Ermüdung mit Abnahme der Kraft kam, sich diese Reduktion der Kraft jedoch in der DIOSTZ- und STZ- Versuchsgruppe abschwächte und sich die Kurven der DIOSTZ- sowie STZ-Tiergruppen von der Kurve der Kontrollgruppe trennten. In der Kontrollgruppe setzte sich der im Vergleich recht starke Abfall der Kraft fort bis bei knapp unter 15% ein Plateau erreicht wurde. Die Kurven der DIOSTZ- und STZ- Versuchsgruppen zeigten im weiteren Verlauf einen schwächeren Abfall der Kraftantwort und stabilisierten sich auf einem höheren Plateau. Ebenso konnte in der Abbildung 25 der Trend eines geringfügigen Anstiegs der Kraft gegen Ende der Kraftmessung beobachtet werden

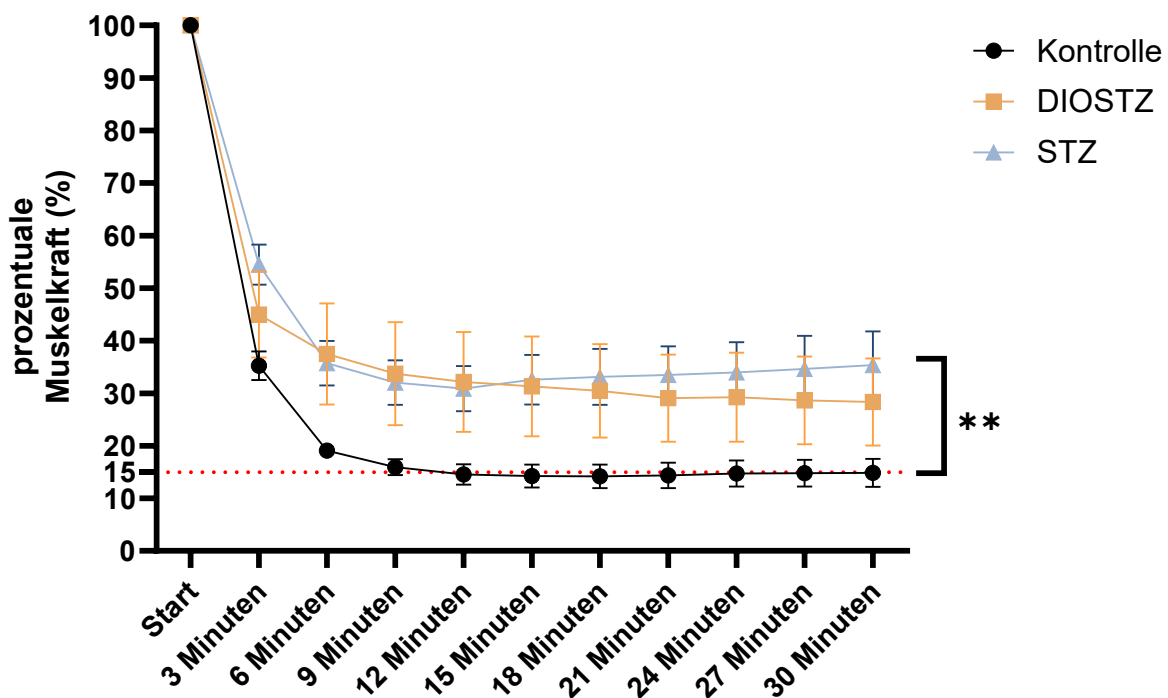


Abb. 25 Darstellung der prozentualen Ermüdungsmessung (Fatigue) im Vergleich der Behandlungsgruppen

Die y-Achse zeigt die prozentuale Kraftantwort im Vergleich zur initialen Kraftantwort auf elektrische Stimulation, auf der x-Achse ist die Zeit dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte (MW) der prozentualen Kraftantwort $\pm$ Standardabweichung der Kontrollgruppe (n=5), der DIOSTZ (STZ + high fat/high sucrose Futter) Gruppe (n=6), der Streptozotocin (STZ) -Gruppe (n=9). Die statistische Analyse erfolgte mittels *TwoWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

In Abb. 26 sind die Ergebnisse der Ermüdungsmessung über die ersten neun Minuten dargestellt, um die Unterschiede in der Kraftantwort zu Beginn der Messung darzustellen. Hierbei wird besonders deutlich, dass beide diabetischen Mausgruppen eine langsamere Reduktion der Kraftantwort als die Kontrolltiere zeigen. Zwischen neun und zwölf Minuten erreichen jedoch alle Tiergruppen ein Plateau. Dieses Plateau liegt in der DIOSTZ als auch STZ-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe.

Außerdem wird ersichtlich, dass die Werte der DIOSTZ Gruppe eine größere Streuung aufweisen, die bei Minute drei einen größeren Unterschied suggeriert. Allerdings überlappen sich die Fehlerbalken der DIOSTZ- und STZ- Tiergruppe, sodass dies im Rahmen der Streuung ein Unterschied suggeriert, der möglicherweise nur durch die Streuung bedingt ist.

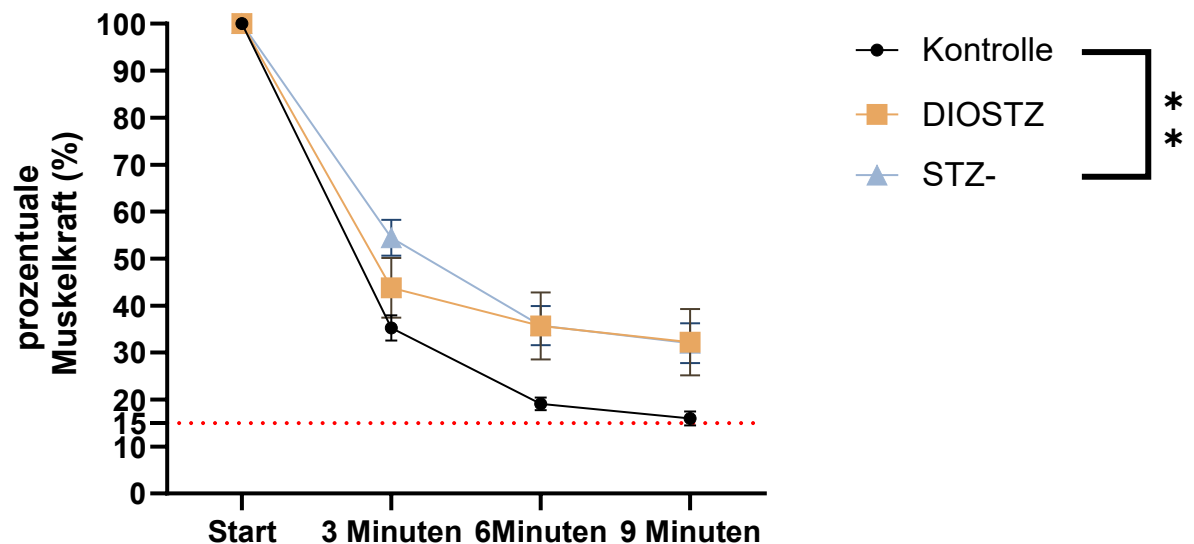


Abb. 26 Darstellung der prozentualen Ergebnisse der Ermüdungsmessung über 9 Minuten

Die y-Achse zeigt die prozentuale Kraftantwort im Vergleich zur initialen Kraftantwort auf elektrische Stimulation, auf der x-Achse ist die Zeit dargestellt, die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte (MW) der prozentualen Kraftantwort $\pm$ den Standardfehler. In der Kontrollgruppe wurden 5 Mäuse untersucht, in der DIOSTZ (STZ + *high fat/high sucrose* Futter) Gruppe wurden 6 Mäuse untersucht, in der Streptozotocin (STZ) -Gruppe wurden 9 Mäuse untersucht, Two Way ANOVA mit Dunnett's Test in Bezug auf die Kontrollgruppe, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede

Darstellung der absoluten Fatigue Messwerte

Anhand der Darstellung der gemittelten absoluten Messwerte aus der repetitiven Ermüdungsmessung (Abb. 27) wird deutlich, dass die Versuchstiere der STZ- (41,88mN) und der Kontrollgruppe (39,3mN) zum Beginn der Ermüdungsmessung auf einem ähnlichen Kraftniveau gestartet sind, wohingegen die DIOSTZ Tiere (14,12mN) bereits zu Beginn der Messung eine deutlich geringere tetanische Kraft aufgebracht hatten. Im Verlauf des Messprotokolls kam es in allen drei Versuchsgruppen zu einer Abnahme der Muskelkraft wie bereits bei den prozentualen Messergebnissen beschrieben. Auffällig war hingegen der Vergleich der Kraftwerte zwischen der Kontroll- und STZ-Versuchsgruppe. Hierbei stellte sich ab der neunten Minute ein Plateau ein. Dieses Kraftplateau lag jedoch in der STZ- Versuchsgruppe mit ungefähr 12 mN deutlich höher im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 5 mN. So wird deutlich, dass die STZ-Tiere zum Ende der Ermüdungsmessung eine höhere Kraft als die Kontrolltiere erzeugten, obwohl beide Versuchsgruppen mit einer ähnlichen Ausgangskraft zu Beginn der Messung starteten. Dies wurde als eine verzögerte Ermüdung der STZ- Tiere interpretiert.

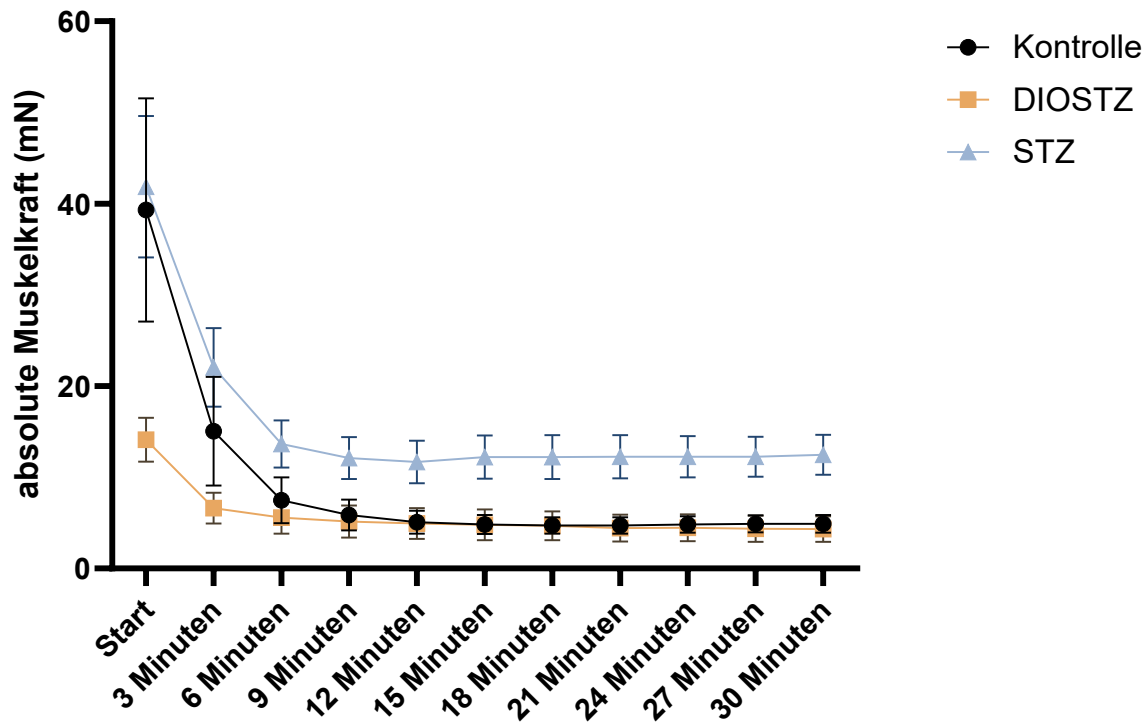


Abb. 27 Darstellung der absoluten Kraftwerte der Ermüdungsmessung

Die y-Achse zeigt die tetanische Kraftantwort in Millinewton (mN) nach elektrischer Stimulation während der Ermüdungsmessung, auf der x-Achse ist die Zeit dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte (MW) der gemittelten absoluten Kraftantwort $\pm$ Standardabweichung der Kontrollgruppe (n=5), der DIOSTZ (STZ + high fat/high sucrose Futter) Gruppe (n=6), der Streptozotocin (STZ)-Gruppe (n=9). Die statistische Analyse erfolgte mittels *TwoWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe.

Paradoxe Weise konnte am Ende der Ermüdungsmessung wieder ein Anstieg der Kraft beobachtet werden. In Abbildung 28 wird deutlich, dass nicht nur die Kraft, sondern auch die Grundlinie am Ende der Ermüdungsmessung wieder ansteigt. Diesen Anstieg zeigten alle drei Versuchsgruppen in unterschiedlicher Ausprägung.

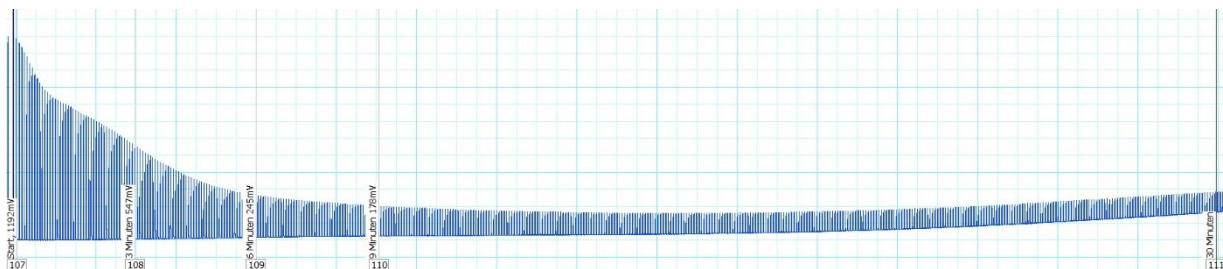


Abb. 28 Darstellung der Ermüdungsmessung am Beispiel eines diabetischen Versuchstieres über 30 Minuten; auf der y-Achse ist die Kraftantwort in mV dargestellt, auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten aufgetragen, dargestellt ist die erfasste Kraftantwort eines diabetischen Versuchstieres über 30 Minuten

3.4 Auswertung der Muskelfasertypenbestimmung

Um die Auswirkungen der fettreichen Ernährung sowie der STZ- Behandlung auf die Muskelfaserzusammensetzung des M. soleus zu analysieren, wurden die Muskelfasertypen I, IIA und IIB immunhistochemisch an 8 μm -10 μm dicken histologischen Muskelquerschnitten angefärbt. Für die histologischen Schnitte wurden neben Tiere aus der 20 Wochen alten Versuchstiergruppe auch 26 Wochen alte DIOSTZ Tiere genutzt. In der Kontrollgruppen - und STZ- Stichprobe wurde neben der Kryokonservierung Muskelgewebe für die biochemische Proteinanalysen benötigt, daher standen lediglich zwei M. solei je Versuchsgruppe für die immunhistochemische Analyse zur Verfügung. Zur Erhöhung der Fallzahlen wurde die DIOSTZ Gruppe mit drei weiteren DIOSTZ Mäusen aus einer zweiten Kohorte von 26 Wochen alten DIOSTZ Tieren ergänzt. Zur Anfärbung der Muskelfasertypen wurden Hybridoma Antikörper genutzt, die in der Arbeitsgruppe Gödecke generiert worden sind, wie in Kapitel 2.1.5 sowie Tabelle 4 und 5 beschrieben. Der Muskelfasertyp I wurde mit einem rot, Typ IIA mit einem grün und Typ IIB mit einem blaufluoreszierenden Sekundärantikörper markiert (Abb. 29). Jedoch muss man an dieser Stelle festhalten, dass die blaue Fluoreszenz des Typs IIB nicht zufriedenstellend funktionierte. Eine Auswertung war dennoch möglich, da die „ungefärbten“ Muskelfasern als Typ IIB gezählt worden sind.

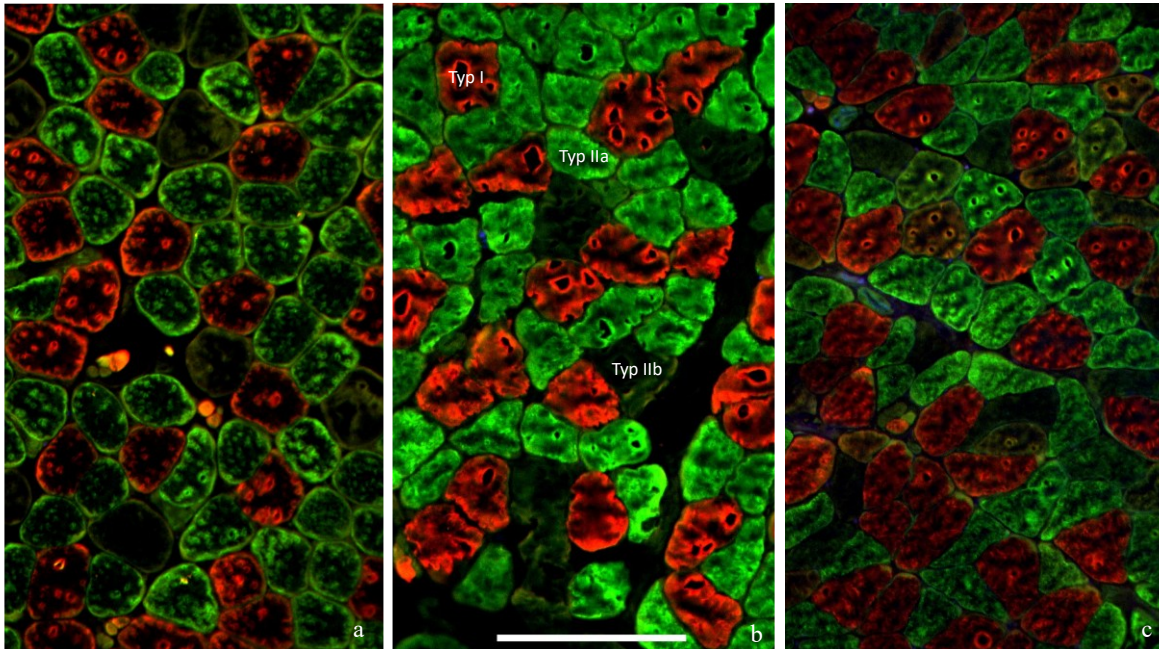


Abb. 29 Darstellung der Muskelfasertypen Färbung,

beispielhafte Bildausschnitte aus den histologischen Muskelquerschnitten mit immunhistochemischer Anfärbung der Muskelfasertypen, rot fluoreszierender Sekundärantikörper (maximale Emission 590nm) $\triangleq$ Typ I, grün fluoreszierender Sekundärantikörper (maximale Emission 520nm) $\triangleq$ Typ IIA, blau/ungefärbt fluoreszierender Sekundärantikörper (maximale Emission 450nm) $\triangleq$ Typ IIB; Schnittdicke: 8 μm ; 20fache Vergrößerung, Maßstab $\triangleq$ 50 μm ; a= Kontrollgruppe, b= DIOSTZ- Versuchsgruppe, c= STZ- Versuchsgruppen; weiterhin zu sehen sind geringe Gefrierartefakte. Insgesamt wurden in der Kontrollgruppe 21 (n=2), in der DIOSTZ- Versuchsgruppe 58 (n=5) und in der STZ behandelten Tiergruppe wiederum 20 (n=2) Muskelquerschnitte ausgezählt. DIOSTZ= *high fat/ high sucrose* und Streptozotocin Behandlung, STZ= Streptozotocin

Die ausgezählten absoluten Werte wurden relativ ins Verhältnis zueinander gesetzt und prozentual ausgewertet (Tabelle 12).

Muskelfasertyp	Kontrollgruppe	DIOSTZ- Versuchsgruppe	STZ- Versuchsgruppe
Typ I	41,04 ± 2,39 %	35,84 ± 0,85 %	44,56 ± 0,06 %
Typ IIA	48,57 ± 0,14 %	59,38 ± 0,59 %	47,67 ± 0,44 %
Typ IIB	10,39 ± 2,53 %	4,78 ± 0,29 %	7,77 ± 0,50 %

Tabelle 12 prozentuale Mittelwerte der Muskelfasertypenbestimmung

Wie in Tabelle 12 deutlich wird, sind die Muskelfasertypen I und IIA prädominant in den Muskelquerschnitten des M. soleus, unabhängig von der Behandlungsgruppe. Allerdings fielen Unterschiede in der Verteilung der Muskelfasertypen in den verschiedenen Behandlungsgruppen auf. So nahm der prozentuale Anteil von Typ IIA Fasern in der DIOSTZ Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich um 10,81% ($p < 0,0001$) zu. In der STZ- Versuchsgruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Erhöhung der Typ IIA Muskelfasertypen nachweisbar. Die Differenz der Typ IIA Muskelfasern zwischen STZ- und DIOSTZ Behandlungsgruppe war mit 11,71% vergleichbar zur Differenz der DIOSTZ- Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe. Bei den Typ I Fasern gab es zwischen der Kontrollgruppe und der STZ-Behandlungsgruppe keine großen Unterschiede, die Differenz der beiden Behandlungsgruppen betrug lediglich 3,52%, was auf eine normale Streuung hindeutete. Allerdings ließ sich hier wiederum ein Unterschied zur DIOSTZ Gruppe von 5,2 % ($p=0,024$) im Vergleich zur Kontrollgruppe beziehungsweise von 8,72 % im Vergleich zur STZ-Versuchsgruppe feststellen. Bei den Typ IIB Fasern konnte festgestellt werden, dass die DIOSTZ- Versuchsgruppe mit 4,78% weniger Typ IIB Fasern aufwies als die Kontrollgruppe oder die STZ- Behandlungsgruppe. Der Unterschied zur Kontrollgruppe betrug dabei 5,61 % ($p=0,0013$) und zur STZ- Gruppe lediglich 2,36%. Auch der prozentuale Unterschied der Typ IIB Muskelfasern zwischen STZ- und Kontrollgruppe betrug lediglich 2,62% und ist damit vergleichbar mit der Differenz der DIOSTZ Tiere zu den STZ- Tieren. Die Unterschiede der STZ- Versuchstiere waren allesamt im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Im Allgemeinen lässt sich aber festhalten, dass der Typ IIB in allen Versuchstiergruppen im Vergleich zu den anderen Fasertypen am wenigsten exprimiert wurde.

Zusammenfassend konnten Unterschiede zwischen der DIOSTZ- Versuchsgruppe und den anderen beiden Versuchstiergruppen festgestellt werden, wohingegen die Verteilung der Muskelfasertypen in der STZ- und Kontrollgruppe annähernd identisch war (Abb.30). Abschließend lässt sich also sagen, dass in der DIOSTZ Behandlungsgruppe die Typ IIA Fasern vermehrt, vorhanden waren und dementsprechend die Typ I und Typ IIB Fasern um denselben Betrag vermindert waren, wobei die größte Abnahme bei den Typ I Fasern nachweisbar war.

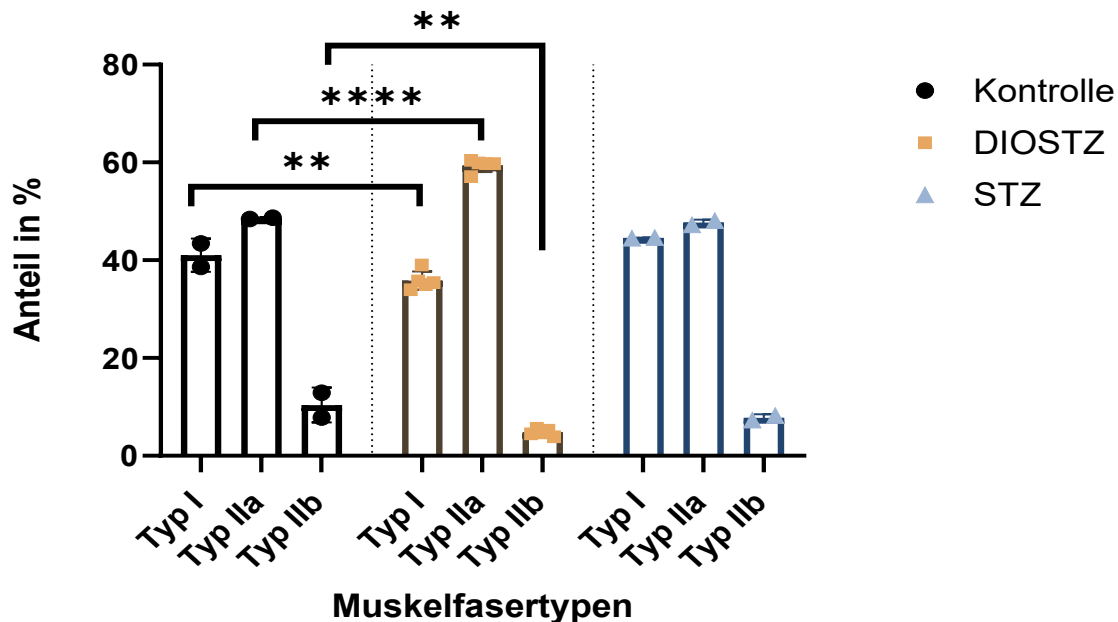


Abb. 30 Darstellung der statistischen Auswertung der prozentualen Muskelfasertypen Verteilung im Vergleich der drei Versuchstiergruppen;

Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der Muskelfasertypen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=2), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=2). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert des prozentualen Anteils der Muskelfasertypen $\pm$ die Standardabweichung, ausgewertete Muskelquerschnitte in der Kontrollgruppe n=21, in der DIOSTZ (n=58) sowie STZ-Gruppe n=20; Die statistische Analyse erfolgte mittels *TwoWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe

3.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Perilipine

Zur Darstellung von Unterschieden im intramuskulären Fettgehalt wurden als Surrogat Marker für die LD die mit diesen assoziierten Perilipine im Muskelquerschnitt immunhistochemisch angefärbt. Da sich Perilipine an die LD anlagern, konnten sie als Surrogat Marker für den LD Gehalt der Muskelzellen genutzt werden [84]. Aufgrund ihrer beschriebene Relevanz für den muskulären Stoffwechsel wurden die Isoformen Perilipin 2 und 5 (PLIN2 und 5) für die Anfärbung ausgewählt [84].

3.5.1. Perilipin 2

Für die immunhistochemische Färbung der PLIN 2 und 5 wurden die identischen Schnitte analog zur Bestimmung der Muskelfasertypen genutzt, sodass in der Kontroll- und STZ- Gruppe zwei Tiere analysiert werden konnten und in der DIOSTZ Tiergruppe insgesamt fünf Versuchstiere. Insgesamt wurden für die Auswertung mindestens neun ROIs aus mehreren Schnitten je Versuchstier ausgewertet, sodass sowohl für PLIN2 als auch für PLIN5 jeweils mindestens 54 ROIs ausgewertet wurden.

In dem aktuellen Stand der Forschung wurde nicht nur eine Zunahme der absoluten Menge der LD beschrieben, vielmehr ist auch eine Zunahme der Größe der LD beschrieben, weshalb sowohl Anzahl als auch prozentualer Anteil bestimmt worden sind [115] [181].

Immunhistochemische Perilipin 2 Färbung

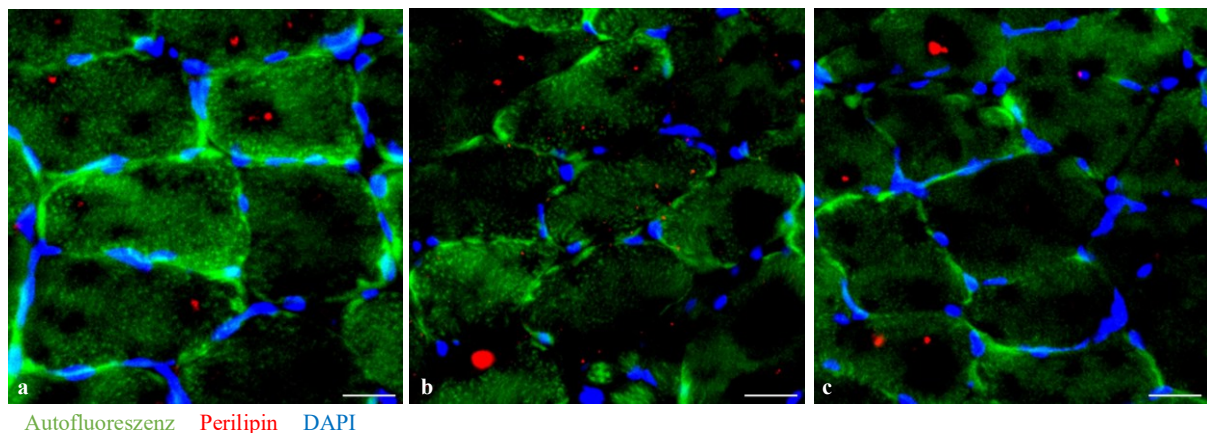


Abb. 31 Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Perilipin Färbung am Beispiel von Perilipin 2; Perilipin2 wurde mit einem rot fluoreszierender Sekundärantikörper (maximale Emission 570nm) markiert, Zellkerne sind durch DAPI blau angefärbt, der Hintergrund erscheint durch Autofluoreszenz grün, dargestellt ist jeweils eine *Region of Interest* (150µm*150µm) im Muskelquerschnitt, a= Kontrolltier, b=DIOS TZ- Versuchstier, c= STZ- Versuchstier, Maßstab entspricht 20µm; DIOS TZ= *high fat/ high sucrose* und Streptozotocin Behandlung, STZ= Streptozotocin

In Abb. 31 ist am Beispiel von Perilipin 2 die immunhistochemische Färbung der Perilipine im Muskelquerschnitt dargestellt. Rein subjektiv erscheinen die Perilipine optisch in Bildausschnitt b im Vergleich zu den Bildausschnitten a und c vermehrt. Dieser optische Eindruck bestätigte sich in der Auszählung der Perilipine und in der prozentualen Auswertung (Tabelle 13).

Auswertung der immunhistochemischen Perilipin 2 Färbung

Tiergruppe	Kontrollgruppe	DIOS TZ-Versuchsgruppe	STZ-Versuchsgruppe
Prozentualer Anteil am ROI	0,30 ± 0,03 %	0,67 ± 0,09 %	0,29 ± 0,01 %
Anzahl	10 ±	35 ± 4	31 ± 18

Tabelle 13 Auswertung der immunhistochemischen Perilipin 2 Färbung;

dargestellt sind die Mittelwerte, gemittelt aus 2 beziehungsweise 5 Versuchstieren mit jeweils mindestens neun ausgewerteten *Region of Interest* (ROI) je Tiergruppe, prozentuale Werte ergaben sich aus der Fläche der Färbung bezogen auf die gesamte Fläche des ROIs, DIOS TZ= *high fat/ high sucrose* und Streptozotocin Behandlung, STZ= Streptozotocin

Im Vergleich der prozentualen Anteile am ROI ergaben sich zwischen der Kontrollgruppe und der STZ-Versuchsgruppe keine großen Unterschiede (Tabelle 13). Im Gegensatz dazu lag der prozentuale Anteil der Perilipine am gesamten ROI in der DIOS TZ- Tiergruppe um 0,37% beziehungsweise 0,38% höher als in den anderen beiden Versuchsgruppen. Es war zu erwarten, dass die Anzahl der gefärbten PLIN2 in der DIOS TZ Versuchsgruppe deutlich höher als in den anderen beiden Versuchsgruppen lag. Allerdings zeigten sich erstaunlicherweise zwischen der STZ- und Kontrollgruppe ebenso deutliche Unterschiede in der Anzahl der LD, bei nahezu gleicher prozentualer Fläche in beiden Gruppen. Dieser Unterschied wird

in Abb. 32a deutlich. Ebenso wird in Abb. 32 a die große Streuung in der Anzahl der gefärbten Perilipine bei den STZ- Versuchstieren deutlich.

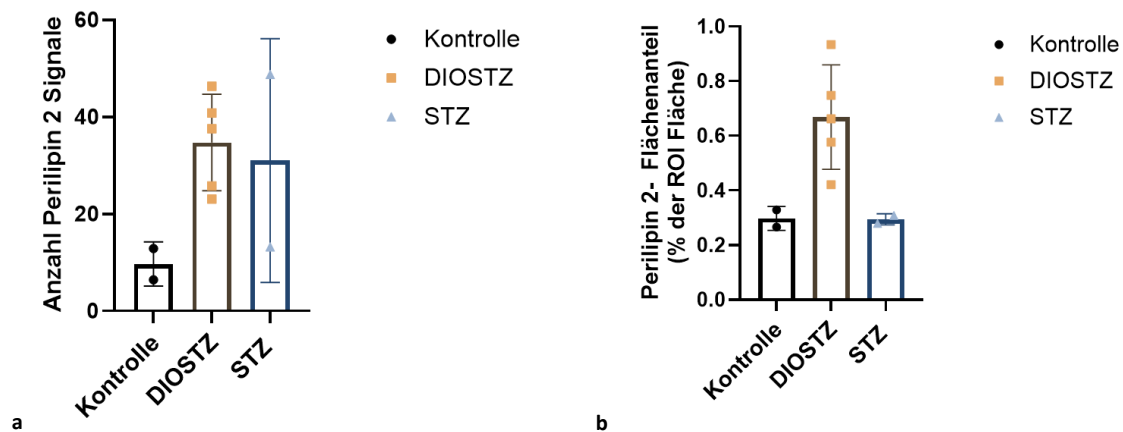


Abb. 32 Darstellung der immunhistochemisch gefärbten Perilipin2 Anzahl sowie des prozentualen Anteils pro *Region of interest* (ROI)

- Perilipin 2 Signal- Anzahl:** Auf der y- Achse ist die Anzahl der ausgezählten Perilipin 2 dargestellt, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=2), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=2). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der Perilipin 2 Anzahl $\pm$ die Standardabweichung; eine statistische Analyse wurde aufgrund mangelnder Aussagekraft bei n=2 in der Kontroll- und STZ- Versuchsgruppe nicht durchgeführt
- Perilipin 2 Flächenanteil:** Die y-Achse zeigt den prozentualen Perilipin 2 Anteil (Maximalwert = 1%), auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=2), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZ n=2). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert des prozentualen Perilipin 2 Anteils $\pm$ die Standardabweichung; eine statistische Analyse wurde aufgrund mangelnder Aussagekraft bei n=2 in der Kontroll- und STZ- Versuchsgruppe nicht durchgeführt

In Abb. 32b ist der prozentuale Anteil der PLIN2 am gesamten ROI sowie die statistische Analyse dargestellt. Hierbei fiel auf, dass die Streuung zwischen den zwei Versuchstieren in der Kontrollgruppe sowie der STZ-Versuchstiergruppe sehr gering war. Dementsprechend errechnete sich der Standardfehler mit 0,03 für die Kontrollgruppe und 0,01 für die STZ- Tiergruppe. Jedoch ergab sich für die Streuung der prozentualen Fläche der PLIN2 Färbung in der DIOSTZ- Gruppe ein anderes Bild. Der Standardfehler errechnete sich hier mit 0,09 was eine deutliche größere Streuung, im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen war.

Abschließend lässt sich festhalten, dass zwischen Kontrollgruppe und STZ- Tieren ein großer Unterschied in der Anzahl der LD bestand, jedoch ergab sich kein relevanter Unterschied in der prozentualen Fläche der LD, was zunächst erstaunlich erscheint. Dies suggeriert, dass die STZ- Versuchstiere zwar mehr LD aufwiesen, diese jedoch kleiner waren. Dieser Eindruck konnte auch subjektiv bei der Auswertung beobachtet werden. In der DIOSTZ- Versuchsgruppe korreliert die Anzahl der LD mit der Größe der prozentualen Fläche der LDs.

3.5.2 Perilipin 5

In Abbildung 33 ist exemplarisch die Perilipin 5 Färbung der drei Versuchsgruppen dargestellt.

Immunhistochemische Perilipin 5 Färbung

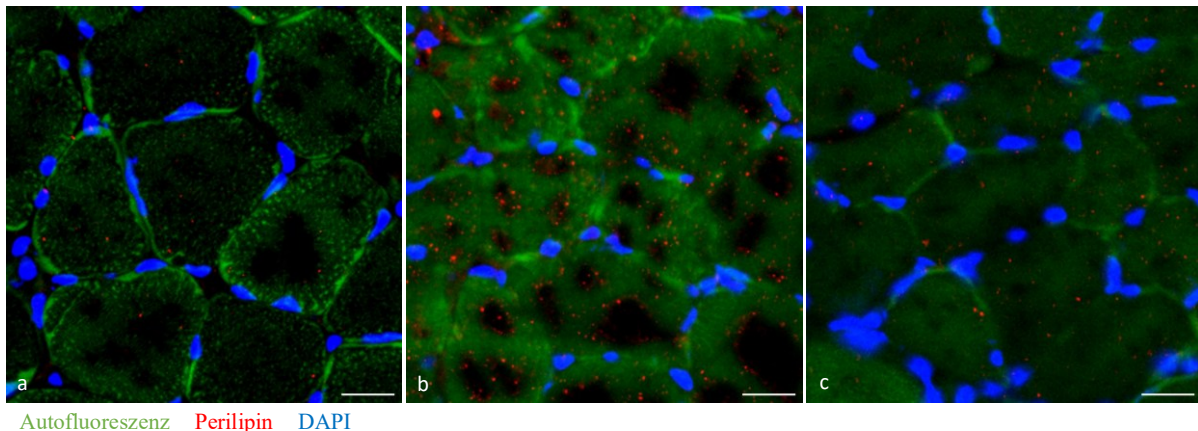


Abb. 33 Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Perilipin Färbung am Beispiel von Perilipin 5
Perilipin5 wurde mit einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper (maximale Emission 570nm) markiert, Zellkerne sind durch DAPI blau angefärbt, der Hintergrund erscheint durch Autofluoreszenz grün, dargestellt ist jeweils eine *Region of Interest* (150µm*150µm) im Muskelquerschnitt, a= Kontrolltier, b=DIOSTZ- Versuchstier, c= STZ- Versuchstier, Maßstab entspricht 20µm; DIOSTZ= *high fat/ high sucrose* und Streptozotocin Behandlung, STZ= Streptozotocin

Auswertung der immunhistochemischen Perilipin 5 Färbung

Die Auswertung der immunhistochemischen PLIN5 Färbung ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tiergruppe	Kontrollgruppe	DIOSTZ-Versuchsgruppe	STZ-Versuchsgruppe
Prozentualer Anteil am ROI	0,20 ± 0,01 %	0,77 ± 0,08 %	0,43 ± 0,04 %
Anzahl	22 ± 12	63 ± 9	48 ± 1

Tabelle 14 Auswertung der immunhistochemischen Perilipin 5 Färbung
dargestellt sind die Mittelwerte gemittelt aus 2 beziehungsweise 5 Versuchstieren mit jeweils mindestens neun ausgewerteten *Region of Interest (ROI)* je Tiergruppe, prozentuale Werte ergaben sich aus der Fläche der Färbung bezogen auf die gesamte Fläche des ROIs, DIOSTZ= *high fat/ high sucrose* und Streptozotocin Behandlung, STZ= Streptozotocin

Aus Tabelle 14 ergibt sich ähnlich wie bei der Perilipin 2 Färbung, dass sowohl die Anzahl der gefärbten Perilipine als auch die prozentuale Fläche in der DIOSTZ behandelten Tiergruppe im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen am größten war. Die Kontrollgruppe wies die geringste Anzahl an gefärbten PLIN5 auf und den geringsten prozentualen Anteil am gesamten ROI. In der STZ- Gruppe ergab sich ein prozentualer Flächenanteil von 0,43%, der damit 0,23% größer war als in der Kontrollgruppe, jedoch um 0,34% kleiner als bei den DIOSTZ Mäusen. Bei der Anzahl ergab sich analog dazu ein ähnliches Bild. Bei den STZ behandelten Mäusen konnten gemittelt 48 gefärbte LD gezählt werden. Das sind 26 mehr als in der Kontrollgruppe, aber 15 weniger als in der DIOSTZ Gruppe.

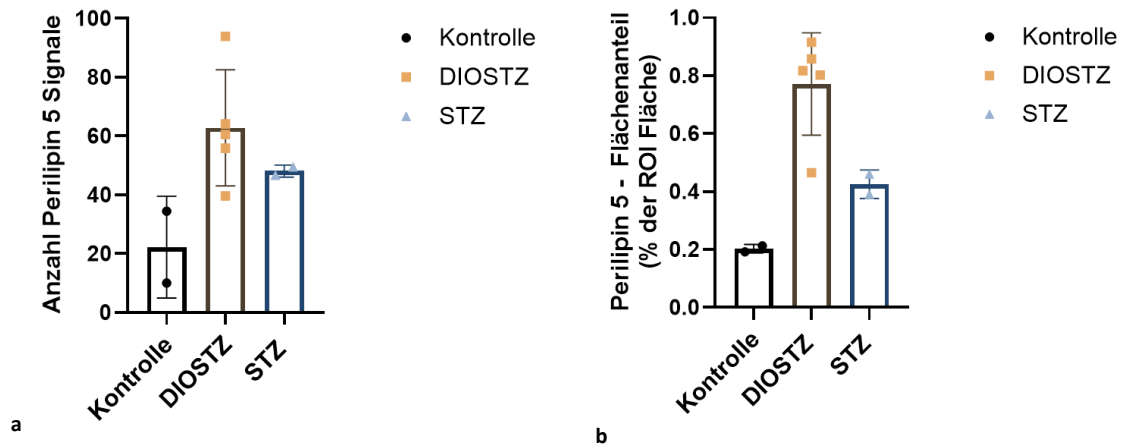


Abb. 34 Darstellung der immunhistochemisch gefärbten Perilipin 5 Anzahl sowie des prozentualen Anteils pro *Region of interest* (ROI)

a) **Perilipin 5 Signal- Anzahl:** Auf der y- Achse ist die Anzahl der ausgezählten Perilipin 5 Anzahl aufgetragen, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=2), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=2), Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der Perilipin 5 Anzahl $\pm$ die Standardabweichung; eine statistische Analyse wurde aufgrund mangelnder Aussagekraft bei n=2 in der Kontroll- und STZ- Versuchsgruppe nicht durchgeführt

b) **Perilipin 5 Flächenanteil:** Die y-Achse zeigt den prozentualen Perilipin 5 Anteil (Maximalwert = 1%), auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=2), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=2), Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert des prozentualen Perilipin 5 Anteils $\pm$ die Standardabweichung; eine statistische Analyse wurde aufgrund mangelnder Aussagekraft bei n=2 in der Kontroll- und STZ- Versuchsgruppe nicht durchgeführt

In Abb. 34a ist die Streuung in der Anzahl der gefärbten Perilipine bei den Versuchstiergruppen dargestellt. Dabei sticht heraus, dass die Streuung in der Kontrolltiergruppe im Gegensatz zur DIOSTZ- und STZ-Versuchsgruppe recht groß war. In Abb. 34b ist der prozentuale Anteil der PLIN 5 am gesamten ROI dargestellt.

Um eine abschätzende Aussage über die Größe der LD machen zu können, wurde sowohl der Flächenanteil als auch die Anzahl der LD bestimmt. Dabei wurden bei PLIN2 in der STZ-Gruppe mehr, aber vermutlich kleinere LD nachgewiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der DIOSTZ Gruppe lagen demnach im Vergleich vermutlich größere LD als in der STZ-Gruppe vor. Für PLIN5 lässt sich anhand der erhobenen Werte kein Zusammenhang interpretieren.

3.6 Auswertung der biochemischen Proteinanalysen (Western Blot).

Zur Analyse von Proteinveränderungen wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl das Titin als auch weitere Proteine biochemisch im *Western Blot* analysiert.

3.6.1 Perilipin 2 und 5

Um die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungsprotokolle auf die intramuskulären Fettspeicher zu quantifizieren, wurden Western Blot Analysen der Perilipine 2 und 5 am Skelettmuskelgewebe durchgeführt und ins Verhältnis mit Aktinin gesetzt. Wie bereits beschrieben, befinden sich Perilipine um die LD herum, sodass diese als Surrogat Marker für die Menge an LD genutzt worden sind.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse sind in Abb. 35 dargestellt. In Abb. 35a sind die Ergebnisse der Perilipin 2 Analysen visualisiert. Dabei lässt sich kein relevanter Unterschied in der relativen Menge von Perilipin 2 zwischen den Kontrolltieren und der STZ behandelten Mausgruppe ($+1,8\% \pm 2\%$) feststellen. Dementsprechend ergab auch die statistische Analyse keine statistische Signifikanz (p- Wert = 0,8863). Allerdings ließ sich in der DIOSTZ- Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren eine um $27,9\% \pm 6,1\%$ erhöhte Perilipin 2 Menge nachweisen. In der statistischen Auswertung ergab sich im Vergleich ein p- Wert von 0,0004 und damit ein hoch signifikanter Zusammenhang.

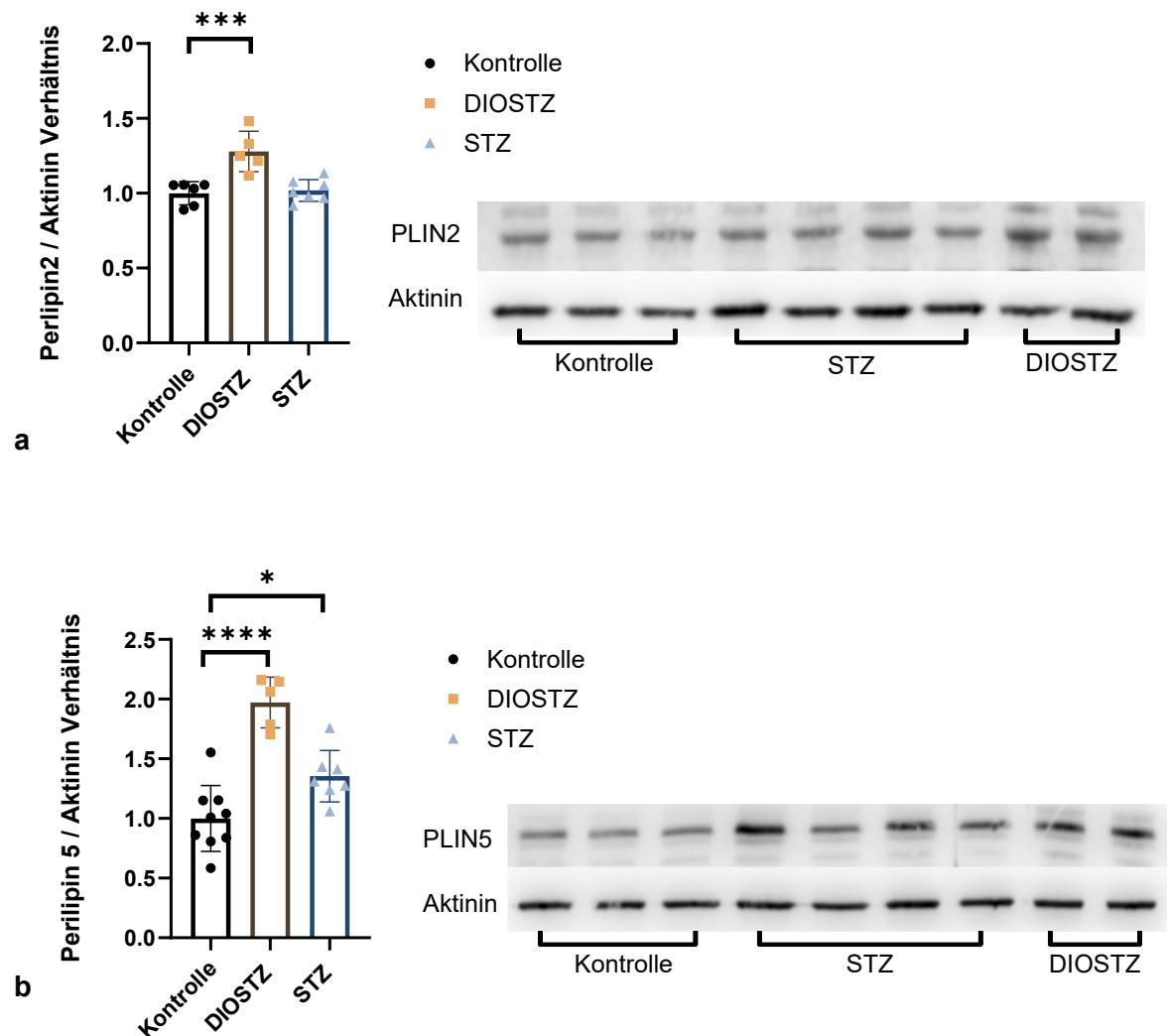


Abb. 35 relative Perilipin 2 und 5 Expression im Vergleich mit Aktinin

- a) **Perilipin 2:** Die y-Achse zeigt die relative Perilipin 2 Expression im Verhältnis zu Aktinin, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=6), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZn=7), Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Perilipin2 Menge $\pm$ die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe, die Blots repräsentieren beispielhaft die durch spezifische Antikörper markierten Perilipin 2 sowie Aktinin
- b) **Perilipin 5:** Die y-Achse zeigt die relative Perilipin % Expression im Verhältnis zu Aktinin, auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=6), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZn=7), Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Perilipin2 Menge $\pm$ die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's Test* in Bezug auf die Kontrollgruppe, die Blots repräsentieren beispielhaft die durch spezifische Antikörper markierten Perilipin 5 sowie Aktinin

Für Perilipin 5 ließ sich in den Western Blot Analysen eine um $97,2\% \pm 9,5\%$ relativ erhöhte Perilipin Menge im Vergleich der DIOSTZ Gewebeproben zu den Gewebeproben der Kontrollgruppe nachweisen. Dieser Zusammenhang war in der statistischen Analyse hoch signifikant. Der Vergleich der relativen Perilipin 5 Menge der STZ- Tiergruppe zur Kontrollgruppe ergab eine um $35,5\% \pm 8,2\%$ erhöhte Perilipin Menge in den STZ- Gewebeproben ohne statistische Signifikanz.

3.6.2 Titin und Proteinkinase C α

Zur Analyse eines potenziellen Einflusses des diabetischen Mausmodells auf die passive Steifigkeit des Titins wurde an mehreren M. solei der Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Versuchsgruppe eine Phosphorylierungsanalyse durchgeführt. Die passive Steifigkeit des Muskelproteins Titin wird, wie bereits beschrieben, durch das Phosphorylierungslevel in der PEVK- Region des Proteins beeinflusst. Eine Proteinkinase, die die PEVK-Region des Titins im Skelettmuskel phosphorylieren kann, ist die PKC α . Daher wurde neben der Phosphorylierungsanalyse der PEVK-Region des Titins zusätzlich die PKC α auf eine aktivierende Phosphorylierung an der Position T 497 untersucht. Als relevante Position für die Steifigkeit von Titin wurde die relative Phosphorylierung des Serins an Position 11878 untersucht.

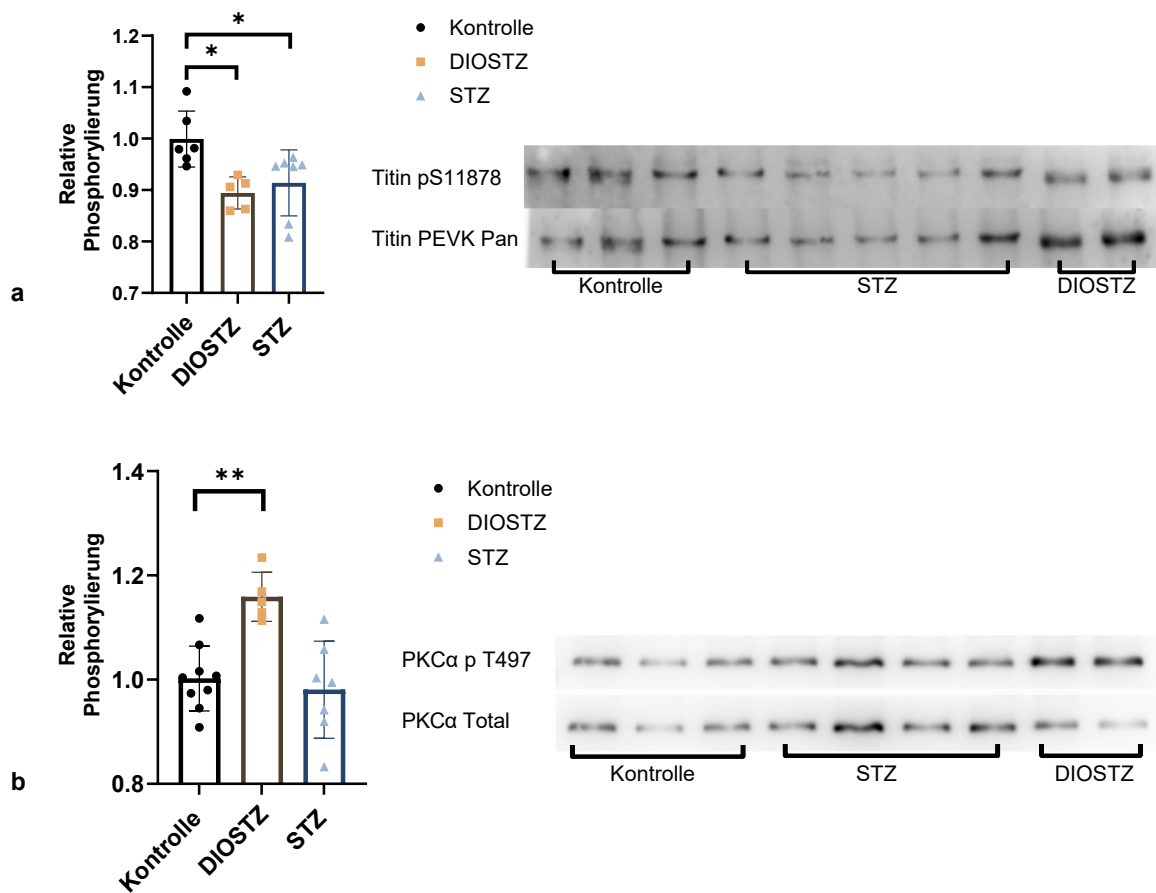


Abb. 36 Relative Titin S11878 und relative PKCT497 Phosphorylierung

- a) **Relative Titin S11878 Phosphorylierung:** Die y-Achse zeigt die relative Phosphorylierung des Titins, die x-Achse stellt die drei Versuchsgruppen dar: Kontrolltiere (Kontrolle n=6), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=7). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Phosphorylierung $\pm$ die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's* Test in Bezug auf die Kontrollgruppe.
- b) **Relative PKC T497 Phosphorylierung:** Die y-Achse zeigt die relative Phosphorylierung der Proteinkinase C (PKC), auf der x-Achse sind die drei Versuchsgruppen dargestellt: Kontrolltiere (Kontrolle, n=9), Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=5), Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=7). Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der relativen Phosphorylierung $\pm$ die Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels *OneWay ANOVA* zum Signifikanzniveau $p < 0,05$, * markiert die statistisch signifikanten Unterschiede; *Multiple Comparison* mittels *Dunnnett's* Test in Bezug auf die Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der Phosphorylierungsanalysen des Serins an Position S11878 des Titins sind in Abb. 36 zusammen mit der statistischen Auswertung dargestellt. Daraus ergab sich eine verminderte Phosphorylierung der STZ- als auch der DIOSTZ- Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Titin der DIOSTZ Versuchstiere ist um $-10,49\% \pm 1,4\%$ weniger phosphoryliert im Vergleich zum Titin der Kontrolltiere. Dieser Unterschied im Phosphorylierungslevel ist statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,01.

Die Phosphorylierungsanalyse der STZ- Tiergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab eine um $8,53\% \pm 2,4\%$ geringfügig reduzierte Phosphorylierung. Nach statistischer Analyse mittels *One Way ANOVA* der Mittelwerte ergab sich für den Vergleich der STZ- und Kontrolltiergruppe eine statistische Signifikanz (p-Wert = 0,02)

Proteinkinase C α

Die Ergebnisse der Analyse der aktivierenden Phosphorylierung an Position T497 der PKC α sind in Abb. 36b dargestellt. Hierbei zeigten sich zwischen der Kontrollgruppe und der STZ- Behandlungsgruppe keine relevanten Unterschiede ($-2,24\% \pm 3,5\%$). Anders verhält es sich in der DIOSTZ- Behandlungsgruppe. In dieser Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um $15,9\% \pm 2,1\%$ vermehrte Phosphorylierung an der Position T497 nachgewiesen werden. Damit bestehen Unterschiede innerhalb des diabetischen Mausmodells. Es errechnete sich ein p- Wert von 0,002 für den Unterschied des Phosphorylierungslevel zwischen dem DIOSTZ – und dem Kontrollgewebe, wodurch dieser als statistisch signifikant gewertet wurde.

Titin Isoformen

Zur Analyse einer Diabetes mellitus bedingten Größenveränderung der Isoform N2A wurde eine Analyse der Isoformen durchgeführt. Dabei konnte keine Veränderung in der Laufhöhe der N2A-Banden in den Versuchsgruppen festgestellt werden. Überraschenderweise konnte aber eine stärkere T2 Bande in der DIOSTZ- Tiergruppe nachgewiesen werden, die in der STZ- und Kontrollgruppe nicht nachweisbar war (Abb. 37). Diese wurde ins Verhältnis zur N2A Bande gesetzt und es ergab sich ein gemittelter Quotient von $0,29 \pm 0,027$ und $0,28 \pm 0,033$ für die zwei DIOSTZ Versuchstiere. Das bedeutet, dass die T2 Bande 29% beziehungsweise 28% der Stärke der N2A Bande aufweist. Dabei ist die Streuung in beiden Tieren vergleichbar.

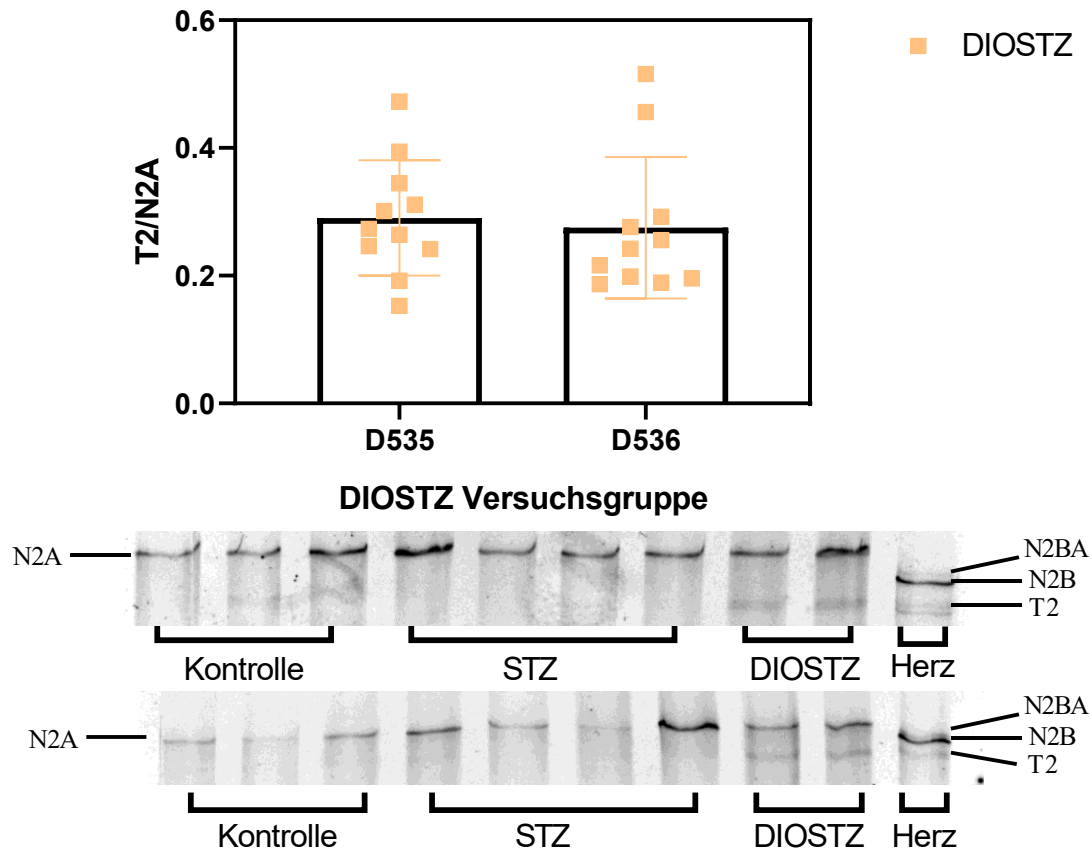


Abb. 37 Titin Isoformen- Verhältnis T2 Bande zu N2A

Dargestellt ist das Verhältnis der T2 Bande zur N2A Isoform sowie die Analyse der Isoformen je Versuchsgruppe; zwischen der Kontrollgruppe (n=6), der Streptozotocin und *high fat/high sucrose* Futter (DIOSTZ, n=2) sowie Streptozotocin + Standardfutter (STZ, n=7) – Behandlungsgruppe war keine Veränderung der Isoform N2A nachweisbar, als Referenzbande wurde eine murine Herzprobe zur Analyse hinzugefügt, Auffällig ist in der DIOSTZ- Versuchsgruppe eine vergrößerte T2 Bande, die in den anderen beiden Versuchsgruppen nicht nachweisbar war, die T2 Bande wurde zu N2A ins Verhältnis gesetzt, weiterhin dargestellt sind exemplarisch Ausschnitte aus der Analyse der Isoformen, sodass jedes Versuchstier mindestens einmal mit einer Isoform-Bande abgebildet wurde

4 Diskussion

4.1 Eignung des Mausmodells für die Fragestellung

Für die Untersuchung der muskulären Dysfunktion ist die Wahl des diabetischen Mausmodells entscheidend. Zur Beantwortung der Fragestellung wurde ein Mausmodell mit STZ-Behandlung in Kombination mit einer *high fat/ high sucrose* Diät und ein Mausmodell mit alleiniger STZ-Behandlung genutzt. Umek et al konnten nachweisen, dass eine *high fat* Diät bei Mäusen erhöhte intramuskuläre Fetteinlagerungen erzeugt [86]. Weiterhin konnten Almeida et al nachweisen, dass Patienten mit Diabetes mellitus Typ II vermehrt LDs in der Muskulatur einlagern und somit das Mausmodell mit *high fat/high sucrose* Futter und STZ Injektionen potentiell geeignet ist, vermehrt LDs in der Muskulatur zu erzeugen [104]. Des Weiteren hat STZ die Eigenschaft, zu einer vermehrten Lipideinlagerung in den Muskelzellen zu führen [168],[188] ohne die Muskelkraft in den S-Typ Fasern zu beeinträchtigen, die im hier verwendeten M. soleus prädominant sind [200]. Somit wurden in der DIOSTZ-Behandlungsgruppe Bedingungen erzeugt, die besonders dazu beitragen, den intramuskulären Lipidgehalt zu erhöhen. Dadurch war es möglich die Beeinflussung der Muskelfunktion durch LDs in der Muskelzelle im Vergleich mit den anderen beiden Behandlungsgruppen zu analysieren. Unter STZ Behandlung kommt es neben erhöhten Blutglukose Werten aber auch zu einer Erhöhung der Blutfettwerte [201],[202],[203], die die hier beobachtete intramuskuläre Lipidakkumulation in der STZ-Gruppe erklären kann. Dabei ist die Besonderheit der alleinigen STZ-Behandlung die Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage ohne Insulinresistenz, wohingegen STZ- Behandlung und *high fat/ high sucrose* Diät (DIOSTZ) in den Mäusen eine diabetische Stoffwechsellage mit Insulinresistenz induziert [182].

In den hier untersuchten Versuchstieren konnte sowohl in den STZ behandelten Mäusen als auch in den Mäusen nach DIOSTZ Behandlung eine Erhöhung des intramuskulären Fettgehalts nachgewiesen werden. So konnte in dieser Arbeit im Sinne eines *proof of concept* gezeigt werden, dass die Kombination aus STZ und HFD dazu geeignet ist, eine starke Akkumulation der LD in vivo hervorzurufen.

4.1.1. Muskel- und Körpergewicht der Versuchstiere

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit HFD sowie STZ erfolgreich war, wurden die Blutzuckerwerte sowie das Gewicht der Mäuse gemessen.

Die STZ-Tiere waren nach der Behandlung im Mittel 20,91% leichter als die Kontrollgruppe, was sich mit bisherigen Literaturangaben deckt (vgl. Kapitel 3.1.1) [204],[205],[206],[168]. Die DIOSTZ- Mäuse sind nach 20 Wochen etwa 8 % leichter als die Tiere der Kontrollgruppe, aber etwa 13% schwerer als die STZ-Tiere. Die Gewichtsabnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe ist hier als ein Effekt der STZ-Behandlung zu interpretieren. Das höhere Gewicht der DIOSTZ- im Vergleich zur STZ Tiergruppe ist durch die lipidreiche Fütterung zu erklären [207],[148],[82],[206],[129]. Die Behandlung mit STZ führt über eine Zerstörung der β Zellen zu einer verminderten Insulin Produktion und folglich auch zu einer verminderten Insulin Wirkung. Trotz der Fütterung mit *high fat/ high sucrose* Futter weisen die Versuchstiere ein, im Vergleich zu Kontrolltieren, geringeres Gesamtgewicht auf. Dies kann als Beleg für die Wirkung des STZ betrachtet werden, da es zu einem Mangel an anabolem Insulin kommt, was zu einer gesteigerten Proteo- und Lipolyse führt [187]. Zudem konnte an Ratten eine verringerte Futteraufnahme unter STZ-Behandlung beobachtet werden, was den Gewichtsunterschied zusätzlich erklären kann [204].

Muskelgewicht der M. solei

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das Gewicht des M. soleus der STZ- Versuchstiere um 9,65% leichter, ohne dabei statistisch signifikant verändert zu sein. Auch in anderen Publikationen konnte eine leichte, wenn auch nicht signifikante, Abnahme der Muskelmasse nachgewiesen werden [168],[204]. Als Erklärung wurde eine höhere Proteolyse sowie ein potenzieller G2 Zyklus Arrest in der Muskulatur nach STZ Behandlung diskutiert [204]. Außerdem kann auch hier der Mangel an Insulin angeführt werden, denn ohne Insulin ist das Wachstum des Muskels erschwert [141]. Krause et al hingegen werteten die Abnahme des Muskeleinzengewichts im Sinne einer diabetischen Myopathie [168]. Die Abnahme des Muskelgewichts in der STZ-Versuchsgruppe kann ebenso mit einer Atrophie in Verbindung gebracht werden, was hier durch die höheren Muskelgewicht/Körpergewicht (MG/KG) Verhältnisse widerspiegelt wird [205],[208]. In der DIOSTZ Tiergruppe wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein durchschnittlich 8,64% höheres Muskeleinzengewicht gemessen, allerdings ebenso ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz. Dies könnte möglicherweise durch den Effekt der HFD erklärt werden [129]. HFD allein führte dagegen in anderen Studien zu keinem signifikanten Unterschied im Muskelgewicht [207],[148]. Die Veränderung des Muskelgewichts nach STZ- Behandlung scheint somit abhängig von Dauer und Zusammensetzung der lipidreichen Ernährung zu sein.

Die MG/KG Verhältnisse der DIOSTZ- und STZ- Tiergruppe sind wiederum im Vergleich zur Kontrollgruppe höher. Dies impliziert, dass das Gewicht des M. soleus einen höheren Anteil am Körpergewicht aufweist. Dies könnte in der STZ-Gruppe durch ein signifikant geringeres Körpergewicht aber auch durch ein im Verhältnis weniger stark reduziertes Muskelgewicht begründet sein, was bedeutet, dass die STZ-Behandlung einen größeren Effekt auf das Körpergewicht hat als auf den Muskel selbst; potenziell vermittelt durch eine geringere Nahrungsaufnahme und zusätzlichen Insulinmangel [205]. Das Körpergewicht der DIOSTZ Tiere ist niedriger als das der Kontrolltiere, aber höher im Vergleich zu den STZ- Tieren. Da auch das durchschnittliche Muskelgewicht der M. solei in der DIOSTZ Tiergruppe höher ist, ergibt sich auch hier ein erhöhter MG/KG Koeffizient, was durch die geringe Zunahme des Muskelgewichts im Rahmen einer HFD erklärt werden könnte.

4.1.2 Blutzuckerwerte

Zur Überprüfung des Effektes der STZ-Behandlung auf das Pankreas wurden die Blutzuckerwerte der Versuchstiere bestimmt. Dabei fiel in der STZ-Behandlungsgruppe im Vergleich zu den anderen beiden Behandlungsgruppen der höchste mittlere Blutzuckerwert auf. Dies beweist, dass die toxische Wirkung der STZ- Behandlung auf die β - Zellen des Pankreas zu einem Insulinmangel geführt hat, was genauso in einigen Publikationen beobachtet werden konnte [204],[208],[206]. Unklar bleibt der niedrigere Blutzuckerwert in der DIOSTZ- Versuchsgruppe im Vergleich zu den STZ- Tieren. Da Magalhães et al. beschrieben haben, dass eine HFD allein bereits zu höheren Blutglukose Werten im Vergleich zur Fütterung mit Standardfutter führt [187] (vgl. Kapitel 1.8.4), war zu erwarten, dass sich die Effekte der STZ-Behandlung sowie der HFD additiv auf den Blutzuckerwert verhalten und daraus ein höherer Blutzuckerwert resultiert.

4.2 Auswirkung der STZ-Behandlung und der HFD auf die Muskelkraft im Rahmen der Kraftmessung

Im Vergleich der Muskeleinzengewichte fällt auf, dass der M. soleus der DIOSTZ Versuchstiere nicht nur der längste, sondern auch der schwerste ist, wodurch eine höhere Muskelkraft erwartbar wäre; dennoch erbrachten die Muskelpräparate im Vergleich die geringsten Kraftwerte (PO und sPO). Der Zusammenhang zwischen geringerer Muskelkraft aber höherem Gewicht ist zunächst nicht trivial.

Hier wurde die Hypothese untersucht, dass eine vermehrte Akkumulation von LD die Interaktion von Aktin und Myosin rein mechanisch stört und das Ineinandergleiten der Myofilamente behindert, was eine verminderte Kraftantwort des Skelettmuskels zur Folge hat.

In der Zusammenschau der Ergebnisse der Kraftmessungen ergibt sich sowohl für die PO als auch die errechnete sPO eine deutliche Abnahme der tetanischen Muskelkraft durch die kombinierte Behandlung von STZ und dem HFD-Futter (PO: -59,4%; sPO-58,5%) im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur STZ-Tiergruppe. Für die Analyse der intramuskulären LD-Akkumulation wurde hier PLIN 5 ausgewählt, da sich das Protein an LD anlagert und bevorzugt in oxidativen Skelettmuskelgruppen (M. soleus) exprimiert wird, wodurch eine Vergleichbarkeit aller Gruppen gegeben ist [89],[110]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der deutlich erhöhte intramuskuläre LD-Gehalt ($+97,2\% \pm 9,5\%$, PLIN 5) in der DIOSTZ-Gruppe ursächlich für die Abnahme der tetanischen Muskelkraft ist. Die im Vergleich geringfügiger erhöhte Akkumulation von LD ($+35,5\% \pm 8,2\%$, PLIN5) in den STZ-Tieren war dagegen offenbar nicht ausreichend, um die tetanische Muskelkraft maßgeblich zu beeinflussen. Somit wird ein Schwellenwert des intramuskulären Lipidgehalts vermutet, bis zu dem die Muskelkraft durch kompensatorische Prozesse erhalten werden kann.

Die Reduktion der Kraftentwicklung in den DIOSTZ Tieren könnte zudem auch auf eine veränderte Zusammensetzung der Muskelfasertypen zugunsten der Typ IIA Fasern zurückzuführen sein (vgl. Kapitel 4.5.2). Umek et al wiesen nach, dass es in Typ IIA Fasern durch eine längerfristige HFD zu einer stärkeren Akkumulation von intramuskulären Lipiden kommt als in den anderen Muskelfasertypen [86]. Da unter STZ Behandlung in Typ IIA Muskelfasern eine Zunahme intramuskulärer Lipide beobachtet wurde, sollte die vermehrte, Diät induzierte, Lipid Akkumulation in Typ IIA Fasern durch die STZ Behandlung noch verstärkt werden [188]. Bei einer Zunahme der Typ IIA Fasern wäre jedoch vielmehr eine Zunahme der Muskelkraft [58],[209],[3] sowie eine schnellere Ermüdung zu erwarten gewesen [61],[3],[62],[58]. Trotz des erhöhten Anteils der Typ IIA Fasern war die Kraftentwicklung in den DIOSTZ Tieren jedoch erniedrigt.

In der Kontrollgruppe, aber auch in der STZ-Tiergruppe, fiel zudem eine starke Schwankung der gemessenen PO-Werte auf. Obwohl die Haltungsbedingungen für alle Versuchstiere identisch waren, könnten Unterschiede, beispielsweise im individuellen Bewegungsverhalten der Tiere, zu einer größeren Streuung der Kraftwerte und auch der Fasertyp-Zusammensetzung führen [22]. So ist bewiesen, dass Unterschiede in der Dauer der Stimulation sowie der Frequenz der Aktionspotentiale zur Ausprägung unterschiedlicher Muskelfasertypen führen, was als Anpassung des Organismus an die unterschiedlichen Aktivitätsmuster verstanden werden kann [58]. Zudem findet sich Evidenz für eine geringere aufgebrachte Kraft der langsamen und oxidativen Typ I Muskelfasern im Vergleich zu den schnellen und glykolytischen Muskelfasern [207]. So lässt sich eine Reihenfolge der aufgebrachten Muskelkraft abhängig von der exprimierten Isoform der schweren Kette des Myosins aufstellen. Dabei produzieren die langsamen oxidativen Fasern die geringste Kraft und die schnellen glykolytischen Typ IIB Fasern die größte Kraft ($I < IIA < IIX < IIB$) [58],[209]. Somit könnte die Zunahme der Typ IIA Fasern und auch das erhöhte Muskeleinzengewicht möglicherweise einen adaptiven Anpassungsprozess darstellen, um die Muskelkraft bei beginnender LD-Akkumulation aufrecht zu erhalten. Dafür spricht, dass diese Veränderungen

ausschließlich in der DIOSTZ Gruppe mit Kraftverlust zu beobachten sind, im Gegensatz zu den anderen beiden Versuchsgruppen. Dies bleibt im Rahmen dieser Forschungsarbeit jedoch unklar und bietet eine Fragestellung für weitere Studien.

In Untersuchung in metabolischen Käfigen konnte festgestellt werden, dass diabetische Mäuse weniger aktiv sind [210]. Krause et al. konnten dies in ihrer Arbeit an STZ behandelten Versuchstiere bestätigen [168]. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass die STZ Behandlung mit einer Abnahme des Körpergewichts einhergeht [168] und dadurch einen Einfluss auf die Muskelkraft haben kann. Inwieweit ein individuell unterschiedliches Bewegungsverhalten sowie interindividuelle Unterschiede in der Muskelkraft eine Erklärung für die erhöhte Schwankung in der Kontrollgruppe darstellen können, kann hier nicht abschließend geklärt werden.

4.2.1. Einfluss der STZ-Behandlung auf die Muskelkraft

Die Versuchstiere der STZ- Gruppe zeigten gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied der gemessenen PO-Werte. Dies erlaubt die Annahme, dass es im M. soleus von diabetischen Typ I Mäusen durch eine STZ- Behandlung zu keiner relevanten Abnahme der Muskelkraft kommt. Auch in der Literatur findet sich Evidenz für die hier gemachte Beobachtung, dass die STZ-Behandlung zu keiner signifikanten Abnahme der gemessenen Muskelkraft führt [200],[168]. Dies scheint zunächst paradox, da es bedingt durch die STZ-Behandlung nachweislich zu Degeneration und Nekrosen in Muskelfasern kommen kann, jedoch finden sich auch vermehrt regenerierende Muskelfasern [188].

Interessanterweise gibt es Evidenz dafür, dass die STZ-Behandlung auf schnell zuckende Muskeln, wie dem M. extensor digitorum longus, einen anderen Einfluss hat als auf die langsamen Muskelgruppen, wie dem M. soleus. So reduziert sich die Kraft in den schnellzuckenden Muskelgruppen, jedoch nicht in den Langsamen, was abhängig von der Verteilung der Muskelfasertypen ist [205]. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass die diabetischen Stoffwechsellage und die STZ-Behandlung eine unterschiedliche Auswirkung auf die jeweiligen Muskelfasertypen haben. So wurde bei den schnellen glykolytischen Typ II Muskelfasern (vor allem Typ IIB) im Vergleich zu den oxidativen Muskelfasertypen vermehrt eine Abnahme beziehungsweise eine Atrophie dieser Fasertypen beobachtet [169],[205]. Der M. soleus der Maus besteht aber vor allem aus Typ I und Typ IIA Fasern und nur zu einem geringen Anteil aus Typ IIB Fasern [59],[58],[129]. Im M. soleus kommt es unter STZ Behandlung oder diabetischer Stoffwechsellage hier und auch in anderen Studien nicht zu einem relevanten Kraftverlust [168],[205], sodass angenommen werden kann, dass vor allem die dominanten Typ I und Typ IIA Fasern zur Kraft des M. soleus beitragen.

Da in dieser Arbeit außerdem keine signifikante Abnahme der Muskelkraft zwischen STZ- und Kontrollgruppe festgestellt worden ist, war demnach auch keine signifikante Veränderung der Muskelfasertypenverteilung in diesen Gruppen zu erwarten, was sich vor allem im Hinblick auf die Typ I und IIA-Fasern bestätigte.

Zudem scheint die Dauer der diabetischen Erkrankung die Muskelkraft zu beeinflussen. Wie bereits in Kapitel 1.8.1 beschrieben, ist bedingt durch eine diabetische Stoffwechsellage eine Abnahme der Muskelkraft zu erwarten, die zusätzlich durch eine diabetische Polyneuropathie verstärkt werden kann [162],[163],[161]. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit am STZ-Tiermodell nicht beobachtet werden. Auch der Einfluss der diabetischen Polyneuropathie konnte durch die direkte elektrische Stimulation der Muskelpräparate vernachlässigt werden. Die oben angeführten Untersuchungen wurden an Patienten mit einer Diabetes Typ I Erkrankungsdauer von mindesten zehn Jahren durchgeführt worden. Als Erklärung wird hier angenommen, dass der Zeitraum nach STZ- Behandlung in dieser Arbeit nicht ausreichend lang gewesen ist, eine Veränderung der Kraft im STZ- Mausmodell hervorzurufen. Damit ergibt sich die Frage,

ob eine Abnahme der Muskelkraft nach einem längeren Zeitraum mit hyperglykämischer Stoffwechsellaage in der STZ-Behandlungsgruppe induzierbar wäre, was in weiteren Studien erforscht werden sollte.

4.2.2 Einfluss der lipidreichen Ernährung in Kombination mit der STZ-Behandlung auf die Muskelkraft

Der Effekt einer HFD auf die Muskelkraft wurde vielfach untersucht und beschrieben. In dieser Arbeit ist es gelungen einen Insulinmangel mit einer HFD in einem Mausmodell zu kombinieren, ohne dabei adipöse Versuchstiere zu erzeugen. Dadurch konnte eine deutliche Akkumulation von LD im Skelettmuskel induziert werden, wodurch eine inverse Korrelation zwischen der Menge der intrazellulären LD-Akkumulation und der Muskelkraft hergestellt wurde.

Es konnte eine deutlich reduzierte Muskelkraft in der DIOSTZ Versuchstiergruppe im Vergleich zu den anderen beiden Versuchstiergruppen festgestellt werden, wofür eine Akkumulation von LDs beziehungsweise von intramuskulärem Fett verantwortlich gemacht wird. In der DIOSTZ Behandlungsgruppe kommt es zum einen durch eine lipidreiche Ernährung, zum anderen aber auch durch die STZ-Behandlung selber zu einer Akkumulation von intramuskulärem Fett [85],[56],[66],[181],[95],[104],[86],[168],[188]. Für die Akkumulation der intramuskulären Lipide im M. soleus als Ursache der reduzierten Muskelkraft der DIOSTZ Mäuse spricht die Beobachtung einer Zunahme der Typ IIA Fasern, da dieser Fasertyp vermehrt Lipide einlagern kann [188],[168],[86].

In der vorliegenden Arbeit wurde als Surrogat Marker für eine intramuskuläre Lipidakkumulation erhöhte Perilipine (PLIN) 2 und 5 Werte verwendet; denn die PLIN steigen nach HFD ebenso an wie intramuskuläre Lipide [112],[118],[110],[89]. PLIN5 wurde hier untersucht, da dieses Protein vor allem in oxidativen Skelettmuskelgruppen wie dem M. soleus exprimiert wird [110],[89]. Für Typ I Fasern bei Diabetes mellitus Typ II wurde bereits eine PLIN5 Erhöhung beschrieben [178]. PLIN2 wurde ausgewählt, da dieses ubiquitär exprimiert wird und vor allem an besonders großen LD zu finden ist [98]. Die Analyse der quantitativen PLIN-Menge erfolgte mittels Western Blot. Zusätzlich wurden histologische Querschnitte des M. soleus angefertigt und die PLIN mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper angefärbt, um Informationen über Größe und Anzahl der LD zu gewinnen. Dabei waren PLIN2 (+ 27,9%) und PLIN5 (+97,2%) in der Menge aber auch in der Anzahl in der DIOSTZ Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Für PLIN5 wurde auch eine Erhöhung in der STZ-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt, die aber geringer als in der DIOSTZ Versuchsgruppe ausfiel. Subjektiv erschienen die LD in der DIOSTZ Versuchsgruppe in der Mikroskopie zudem vergrößert. Die starke Erhöhung der PLIN in den DIOSTZ Tieren wurde einem additiven Effekt der HFD und der STZ-Behandlung zugeschrieben.

Der M. soleus als *slow twitch* Muskel der Maus hat, im Vergleich zum M. extensor digitorum longus als *fast twitch* Muskel, einen 3,2fach höheren Fettgehalt, der sich durch lipidreiche Ernährung noch weiter steigern ließ. Dies erscheint physiologisch sinnvoll, da das intramuskuläre Fett in den *slow twitch* Muskeln zur Energiegewinnung genutzt wird [129]. Ungeachtet dessen konnten mehrere Studien bereits einen Zusammenhang zwischen vermehrten intramuskulären LD und einer Abnahme der Muskelkraft herstellen [206],[148],[129].

Auch unabhängig von einer diabetischen Erkrankung konnten Choi et al einen inversen Zusammenhang zwischen der Anzahl und Menge der LDs in der Muskelzelle und der aufgetragenen absoluten und spezifischen Muskelkraft nachweisen. Als Ursache wurden veränderte mechanische Eigenschaften des Querbrückenzyklus während der Muskelkontraktion diskutiert [211].

Im Gegenzug konnten Kim et al im Mausmodell zeigen, dass auch ein Mangel an LD zu einer deutlichen Abnahme der absoluten und spezifischen Muskelkraft führt, was zeigt, dass LD als Energiequelle

unbedingt notwendig sind [2],[85],[93],[211]. Daher bleibt festzuhalten, dass LD eine wichtige Energiequelle für die Muskulatur sind [93],[211],[2],[85].

Es wird spekuliert, dass es möglicherweise erst durch die massive Akkumulation von intramuskulären Lipiden zu einer mechanischen Beeinträchtigung der Myofilamente während der Muskelkontraktion kommt, die für Abnahme der Muskelkraft verantwortlich ist [93].

Turner et al stellten eine Korrelation zwischen der Höhe des Fettsäureangebots und der Größe der LD-Zunahme her. Je größer das Fettsäureangebot, desto mehr LD wurden eingelagert und desto höher war der Kraftverlust [95]. Dies deutet auf einen Dosisabhängigen Effekt hin. Sowohl unter STZ-Behandlung als auch unter HFD kommt es zu einer Erhöhung der Blutfettwerte, deren Effekte sich in Kombination addieren können [202],[201],[203],[86]. Demnach wurde die unveränderte Kraftantwort der STZ-Tiere trotz einer Erhöhung der LD als dosisabhängiger Effekt interpretiert. So fiel die Akkumulation der LD in der STZ-Tiergruppe geringer aus als in der DIOSTZ Versuchsgruppe und die Kraft blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinträchtigt. Daher scheint es ein physiologisches Maß der Menge der LD zu geben mit einem starken Einfluss auf die Muskelfunktion. Dies stützt die Hypothese, dass es erst durch eine starke Einlagerung von LD zu einer Beeinflussung der Muskelkraft kommt

Auch die Größe der LD kann einen Einfluss auf die Muskelfunktion haben, da abhängig von der Größe die Verstoffwechslung der LD beeinflusst wird. Denn große LDs haben ein ungünstiges Oberflächen Volumen Verhältnis und können somit nicht gut verstoffwechselt werden [212],[84]. In der Muskulatur von Patienten mit Typ II Diabetes mellitus Erkrankung findet sich nicht nur eine erhöhte Anzahl und Menge an LD, sondern auch stark vergrößerte LD in einer subsarkolemmalen Lokalisation [181],[178]. Auch in dieser Arbeit wirkten die LD in den DIOSTZ Versuchstieren rein subjektiv vergrößert. Ergänzend fanden Andrich et al ebenso einen Zusammenhang zwischen der Größe der LD und einer Reduktion der Muskelkraft. In einer Untersuchung des Ratten M. soleus nach HFD konnten vergrößerte LD aber keine Zunahme der Anzahl der LD nachgewiesen werden, sodass Andrich et al annahmen, dass nicht eine höhere Anzahl aber ein größeres Volumen der LD die Muskelkraft negativ beeinflusst [97].

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die PLIN2 Expression mit der Größe der LD korrelieren kann. So findet man auf der Oberfläche von sehr großen LD in diabetischen Patienten vermehrt PLIN2 [115]. Außerdem wird PLIN2 durch eine HFD vermehrt exprimiert, was die hier deutlich erhöhten PLIN2 Werte in der DIOSTZ Gruppe erklären könnte [118]. Vor diesem Hintergrund ist durchaus wahrscheinlich, dass in der DIOSTZ Tiergruppe vergrößerte LD vorliegen. Diese Hypothese müsste jedoch durch genauere Analysen der LD-Dimensionen überprüft werden.

Zusammengenommen ergibt sich die Hypothese, dass besonders die großen und schlecht metabolisierbaren LDs einen möglicherweise hinderlichen Einfluss auf die Sarkomer Verkürzung haben, was die Abnahme der Muskelkraft in der DIOSTZ Tiergruppe erklären kann. Die bei Diabetes mellitus Typ II deutlich vergrößerten LD liegen subsarkolemmal und damit intrazellulär. Bei einer Muskelkontraktion kommt es aufgrund der Verbindung des Zytoskeletts mit der Plasmamembran und den Myofilamenten über eine Kraftübertragung auf das Sarkolemm zu einer Verkleinerung des intrazellulären Raumes der Muskelzelle (vgl. Kapitel 1.1.2). Dabei können die deutlich vergrößerten LD möglicherweise die Sarkomere komprimieren beziehungsweise die Position von Aktin zu Myosin verändern und durch die maximale Muskelkraft negativ beeinflussen. Es ist denkbar, dass es bei maximaler Kontraktion und damit maximaler Verkürzung der Muskelzellen durch die LD dann intrazellulär zu einem verringerten Platzangebot kommt, welches zu einer mechanischen, sterischen Beeinträchtigung der Myosin-Aktin-Interaktion mit reduzierter Muskelkraft führt. Die mit Diabetes mellitus Typ II assoziiert deutlich vergrößerten LD können die isolierte Reduktion der Muskelkraft in der DIOSTZ Gruppe erklären, da PLIN2 nur in der DIOSTZ Gruppe erhöht ist.

In dieser Arbeit wurden zwar anhand der Perilipine 2 und 5 als Surrogat Parameter der Lipidgehalt der Muskelpräparate bestimmt, allerdings war es nicht möglich, dies mit dem Muskelfasertyp zu korrelieren. Zur Erhöhung der Aussagekraft wäre es sinnvoll gewesen, den intramuskulären Fettgehalt je Muskelfasertyp zu bestimmen. Weiterhin erscheint eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Größe sowie der Lokalisation der LDs in der Muskelzelle sinnvoll, um die Hypothese zu bestätigen. Des Weiteren erfolgte die immunhistochemische Färbung von PLIN2 und 5 hier getrennt voneinander. Eine elegante Lösung wäre es, beide PLIN in einem histologischen Schnitt zu färben und dies zusätzlich mit der Größe der LD zu korrelieren. Es gibt Erkenntnisse, dass die Kombination von PLIN2 und PLIN5 auf der Oberfläche der LD zu einer besseren Metabolisierung während Muskelaktivität führen [104], sodass eine parallele Färbung sinnvoll ist, um Hinweise auf die Rolle von PLIN2 und 5 in der Reduktion der Muskelfunktion aufzudecken.

Inwiefern sich die LD über Veränderungen des Myozyten Stoffwechsels auf die Sarkomerfunktion auswirken, ist noch weitgehend unklar. Arbeiten von Almeida et al zeigten, dass Diabetes mellitus Typ II keine signifikante Auswirkung auf die Fettsäureoxidation hat und es bei Adipositas sogar zu einem größeren Kontakt der Mitochondrien und den LD kommt [181],[104]. Eine Erhöhung der LD-Menge muss daher nicht zwangsläufig schädlich sein, wenn gleichzeitig die oxidaktive Kapazität erhöht ist [103],[56],[82].

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es viel Evidenz für eine Assoziation zwischen einer Akkumulation der LD und einer reduzierten Muskelkraft gibt. Der inverse Zusammenhang zwischen Muskelkraft und Akkumulation von LD konnte in dieser Arbeit am Beispiel eines Diabetes mellitus Typ II Modells eindrucksvoll gezeigt werden. Dabei war die Abnahme der Muskelkraft im diabetischen Typ II Mausmodell erwartbar, aber eine Zunahme der kräftigeren Typ IIA Fasern sowie die Abnahme der Typ I Fasern als möglicher Kompensationsmechanismus jedoch überraschend.

4.3 Einfluss der Titin Veränderungen auf die Muskelkraft und die optimale Muskellänge

Zur Berechnung der spezifischen Kraft wurde jeweils die optimale Muskellänge gemessen, die nun mit den Ergebnissen der Titin-Phosphorylierung in der PEVK-Region korreliert werden kann. Unter der optimalen Muskellänge versteht man in diesem Kontext, die durch Dehnung erreichte experimentelle Muskellänge, bei der im Myograph die maximale Kraftantwort erzeugt werden konnte. Bei Analyse der Messergebnisse konnte die deutlich reduzierte Muskelkraft in der DIOSTZ- Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen mit der höchsten optimalen Muskellänge aller Versuchsgruppen korreliert werden. Diese Ergebnisse werden im Folgenden im Hinblick auf die Rolle des Titins, anderer Sarkomerproteine und der LD- Akkumulation diskutiert.

Die Aktinfilamente bilden eine Art Gerüst in das die Myosinfilamente hineingleiten wodurch über eine Längenänderung der Sarkomere Kraft erzeugt wird [11]. Dabei hat die Position der Myofilamente einen Einfluss auf die aktive Muskelkraft, wobei Titin von großer Bedeutung ist, denn unter physiologischen Bedingungen positioniert es Aktin und Myosin optimal zueinander [23]. Durch seine Funktion als molekulare Sprungfeder entstehen am Titinfilament bei Sarkomer Dehnung und Kompression Rückstellkräfte, welche die ursprüngliche Sarkomer Länge und damit die Ausgangsposition der Myofilamente wieder herstellen können [45]. Weiterhin hat Titin einen großen Einfluss auf die passive Muskelsteifigkeit [23],[43],[77]. Über die Titin basierte passive Spannung kann die Länge der Myosinfilamente verändert werden, aber auch der interfilamentäre Abstand der A- Bande und der Z- Scheiben [77]. Abhängig von der Steifigkeit des Titins ist eine stärkere Dehnung für den Anstieg der passiven Spannung im Titin notwendig [23],[39],[42]. Zusätzlich ermöglicht die Position des Titins im Sarkomer, abhängig von der passiven Spannung des Proteins, die Übertragung von Spannung auf das Myosinfilament [77]. Eine Dehnung des Sarkomers bei der Einstellung der LO führt auch zu einer

Dehnung des Titins, welche auf die Myosinfilamente übertragen wird. Durch die Dehnung der Myosinfilamente werden die Myosinköpfe in einen *primed* Status (vgl Kapitel 1.5.2) überführt und je mehr Myosinköpfe im *primed* Zustand sind, desto größer ist die Kraftentwicklung, was auch zur längenabhängigen Aktivierung (LDA) beiträgt. Damit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Steifigkeit des Titins und der Muskelkraft beziehungsweise der LDA [76],[77],[213].

4.3.1 Einfluss der Titin- Veränderung auf die optimale Muskellänge

Die Steifigkeit des Titins kann unter anderem über die posttranslationale Phosphorylierung der PEVK-Region moduliert werden [23]. Eine Phosphorylierung der PEVK-Region an Position S11878 führt zu einer Zunahme der Steifheit sowie der passiven Spannung [45], somit führt im Umkehrschluss eine Hypophosphorylierung zu einer Abnahme der passiven Spannung, was eine höhere optimale Muskellänge bedingt. Die Werte der optimalen Muskellänge sind in den diabetischen Versuchstieren dieser Arbeit im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Diese Beobachtung korreliert mit einer gegenüber den Kontrolltieren verringerten Phosphorylierung von Titin in der PEVK-Region in den diabetischen Versuchstieren (Position S11878), was auf eine verminderte passive Steifigkeit des Muskels hindeutet [23],[45]. Somit ist für die hier untersuchten diabetischen Mausmodelle nachgewiesen worden, dass es in diabetischer Skelettmuskulatur durch Hypophosphorylierung der Titin PEVK- Region zu einem inversen Zusammenhang zwischen Titin Steifigkeit und der LO kam. Das Titin mit verringerter Steifigkeit kann der passiven Dehnung bei Einstellung der LO weniger Widerstand entgegensetzen, somit muss der Muskel weiter aufgedehnt werden, um die maximale Kraftantwort zu erzeugen. Dies kann die erhöhte LO in diabetischen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren erklären.

Eine PKC α vermittelte Phosphorylierung an der Position S11878 der PEVK- Region im Titin Molekül kann die Steifigkeit des Proteins modulieren [45]. Auch in der Herzmuskulatur von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II konnte eine Erhöhung der PKC α T497 Phosphorylierung nachgewiesen werden allerdings mit einer Hyperphosphorylierung der S11878 Position einhergehend [214]. In Anbetracht der erhöhten aktivierenden Phosphorylierung der PKC α an der Position T497 wäre allerdings ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung der Position S11878 in der DIOSTZ- Gruppe erwartbar gewesen [46],[45]. Dieser vor allem für Herzmuskulatur vielfach beschriebene Zusammenhang ließ sich in den hier untersuchten Gewebeproben allerdings nicht herstellen. Im DIOSTZ Modell kam es zwar zu einer Aktivierung der PKC α , die in den STZ-Tieren nicht nachweisbar war, doch in den Soleus Muskeln der DIOSTZ- und STZ-Tiere war eine verminderte Phosphorylierung von Titin an Position S11878 nachweisbar. Die Aktivierung der lipidsensitiven PKC α ist gut mit der erhöhten LD-Einlagerung in den DIOSTZ Tieren vereinbar [46],[47],[48]. Hidalgo et al. zeigten, dass eine Aktivierung von Phosphatasen die Phosphorylierung an Position S11878 im Titin rückgängig machen können [45], was als potentielle Erklärung für die beschriebene Abnahme der relativen Phosphorylierung in den diabetischen Tieren dienen könnte. Denkbar wäre hier eine Beteiligung der Proteinphosphatase 1, die zwar durch Insulin aktiviert wird, aber durch zahlreiche weitere Faktoren wie Glykogen oder Glucose Angebot in ihrer Aktivität reguliert werden kann [215],[216]. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch unklar, woraus sich eine Fragestellung für neue Forschungsarbeiten ergibt.

Im aktuellen Stand der Forschung finden sich keine Publikationen zur Modifikation des Titins im diabetischen Skelettmuskel; der Großteil der bestehenden Evidenz untersucht die Auswirkung einer diabetischen Erkrankung auf das Myokard. Eine Übertragung der Ergebnisse zu den Titin Modifikationen im Myokard auf den Skelettmuskel erscheint aufgrund der unterschiedlichen Expression der Titin Isoformen nicht direkt möglich [45],[44].

4.3.2 Einfluss der Titin Veränderungen auf die Muskelkraft

Bei der biochemischen Analyse der Titin- Veränderungen konnte in dieser Arbeit erstmals eine Assoziation zwischen der, durch Hypophosphorylierung der PEVK-Region (S11878) bedingten, reduzierten Titin Steifigkeit in den diabetischen Versuchstieren und der reduzierten Muskelkraft am intakten Skelettmuskelpräparat hergestellt werden.

Bedingt durch die reduzierte Steifigkeit des Titins veränderte sich die Fähigkeit des Proteins die Myofilamente Aktin und Myosin optimal zueinander zu positionieren [75] aber auch die LDA wird reduziert [77],[76]. Die geringere passive Steifigkeit des Titins geht somit mit einer Abnahme der Kraft einher, da die Zahl der möglichen Querbrückenzyklen und die LDA reduziert werden [213],[76],[75],[74],[29],[34]. Dies kann den deutlichen Kraftverlust in der DIOSTZ-Versuchsgruppe erklären. Es wird angenommen, dass die Einstellung der LO zwar die Überlappung der Myofilamente optimiert, jedoch den Effekt des schlafferen Titins auf die LDA nicht ausgleichen kann [76].

Limitierend bleibt hier anzuführen, dass dieses Modell der Komplexität in vivo nicht gerecht werden kann, denn es gibt multiple modulierende Einflüsse auf die Steifigkeit des Titins (vgl. Kapitel 1.2.3), wo von in dieser Arbeit nur die Phosphorylierung der PEVK- Region analysiert wurde. So wurde hier nur exemplarisch eine einzelne Phosphorylierungsstelle untersucht, jedoch spielen viele weitere Phosphorylierungsstellen aber auch Isoformen eine Rolle bei der Modifikation der Titin Steifigkeit. Es kann durchaus auch zu Modifikationen an anderer Position kommen [45],[44], die die Steifigkeit erhöhen und dadurch den Effekt der Hypophosphorylierung an Position 11878 konterkarieren, was möglicherweise den Unterschied der PO zwischen STZ und DIOSTZ Tieren erklären kann. Zur Verifizierung und Aufklärung der komplexen Mechanismen der Diabetes mellitus induzierten Veränderungen sollte in weiteren Arbeiten eine umfassende Analyse der Phosphorylierungsstellen erfolgen.

Ein weiterer potenzieller Mechanismus, der die Abnahme der Kraft in der DIOSTZ Tiergruppe erklären kann, ist eine PKC α vermittelte Phosphorylierung des Troponin I in der DIOSTZ Versuchsgruppe, die zu einer Abnahme der Muskelkraft durch Hemmung des Querbrückenzyklus führt [217]. Dafür spricht die erhöhte PKC α Aktivität in der DIOSTZ Gruppe in Korrelation mit der deutlich reduzierten Kraftantwort. In der Kontroll- und STZ- Gruppe weist die PKC α in Relation kein signifikant anderes Phosphorylierungslevel auf, jedoch kann zwischen diesen beiden Gruppen auch keine signifikante Veränderung der PO und sPO nachgewiesen werden. Zur Aufklärung ist hier eine Phosphorylierungsanalyse des Troponin I in den drei Versuchsgruppen in zukünftigen Projekten hilfreich. Die PKC α kann neben einer aktivierenden Phosphorylierung auch durch Phospholipide oder durch DAG bei Anwesenheit von Ca²⁺ aktiviert werden. In der diabetischen Skelettmuskulatur kommt es zu einer Regulationsstörung des Ca²⁺, die in Kombination mit der Akkumulation von LD, die von einer Hülle als Phospholipiden umgeben sind, potenziell zu einer Aktivierung der PKC α in der DIOSTZ Tiergruppe beitragen können [56],[218],[200],[48]. In der Literatur wird dieser Effekt der Ca²⁺ Regulationsstörung vermehrt in Diabetes Mellitus Typ II erkrankten Tiere beschrieben. Die Ca²⁺ Regulationsstörung kann auch eine Relevanz für die viskoelastischen Kräfte des Titins haben. Diese Kräfte beruhen auf einer Interaktion des Titins mit Aktin und werden durch Anwesenheit von Ca²⁺ in der Zelle beeinflusst. So wird die Bindung zwischen Aktin und der N2A Domäne im Titin durch die Anwesenheit von Ca²⁺ verstärkt, was zu einer Zunahme der Muskelsteife führt. Es gibt begrenzte Evidenz für die Verstärkung dieser Bindung durch erhöhte Ca²⁺ Spiegel, was den physiologischen Effekt einer erhöhten Steifheit des Titins bei Muskelkontraktion hätte. Aber auch über diesen Mechanismus hat eine Ca²⁺ Regulationsstörung einen Einfluss auf die passive Steifigkeit des Titins [219] und somit eine Auswirkung auf die Muskelkraft.

Bei einer Analyse der Titin Isoformen fiel in der DIOSTZ-Tiergruppe eine deutlich sichtbare und stärkere T2 Bande auf, was ein Hinweis auf eine vermehrte Degradation sein kann und ebenso ein möglicher

Einflussfaktor auf die Muskelkraft. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch keine Aussage darüber zu, welche Mechanismen zu der erhöhten Degradation von Titin führen. Aufgrund der fehlenden Insulinwirkung bei einer Diabetes mellitus Erkrankung kommt es zu Proteinveränderungen, einem erhöhten Proteinumsatz und einer vermehrten Proteindegradation [159]. Im Rahmen des Diabetes mellitus und auch einer Hyperglykämie kommt es zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die bevorzugt mit den Aminosäuren Lysin und Prolin der PEVK-Region interagieren können, was unter anderem zu intramolekularen Disulfidbrücken führen kann und nachfolgend möglicherweise zur Anheftung einer Karbonylgruppe [160]. Unter Stressbedingungen, beispielsweise durch oxidativen Stress, kann es zu Proteinaggregationen innerhalb des Titins kommen, was zu einer erhöhten Titin Steifigkeit führt [220]. Ob in den hier verwendeten Muskelproben eine veränderte Disulfidbrücken-Bildung vorliegt, bleibt jedoch unklar und könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Durch eine Oxidation werden Proteine anfällig für eine Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau [160],[159]. Daher ist es sinnvoll, die Ubiquitinierung sowie die Degradation des Titins zu analysieren, beispielsweise über eine spezifische Analyse der T2-Bande, die aus trunkiertem Titin besteht [221],[222]. Außerdem kommt es unter Stressbedingungen der Zelle als Schutz des Titins im Sinne der Proteinqualitätskontrolle zu einer vermehrten Expression von *Heat Shock* Proteinen wie HSP27 oder α B-crystallin, die in der Immunglobulin-ähnlichen Domäne in der I-Bande binden können und einen Einfluss auf die Steifigkeit haben [220],[219],[223]. Daher erscheint auch eine Analyse der *Heat Shock* Proteine HSP27 oder α B-crystallin in weiteren Arbeiten sinnvoll. Schließlich scheint auch vor dem Hintergrund der diabetischen Erkrankung eine Analyse der Atrophie-Marker in Zukunft sinnvoll.

4.4 Einfluss der HFD und des Diabetes mellitus auf die Ermüdung des Skelettmuskels

Um die muskuläre Ermüdung quantitativ zu bestimmen und objektiv zu bewerten, wurde an den isolierten Muskeln eine *Fatigue*-Messung durchgeführt. Im klinischen Alltag sind *Fatigue*-Messungen an Patienten wichtig, um die verbleibende muskuläre Leistungsfähigkeit zu bestimmen und bei der Diagnose von Erkrankungen wie metabolischen Myopathien zu helfen, die sich durch vorzeitige Ermüdbarkeit und Muskelschwäche äußern.

Vor dem Hintergrund einer reduzierten maximalen ATP-Produktionskapazität sowie einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion in der diabetischen Muskulatur [166],[167],[150] als auch einer durch Insulinmangel beeinträchtigten Glukoseversorgung (vgl. Kapitel 1.8.1) war eine reduzierte Ermüdungsresistenz zu erwarten. Interessanterweise zeigten die beiden diabetischen Mausmodelle in dieser Arbeit jedoch eine langsamere Ermüdung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als mögliche Ursachen für die erhöhte Ermüdungsresistenz werden nachfolgend Veränderungen der Muskelfasertypen-Zusammensetzung und die Akkumulation von intramuskulären Lipiden diskutiert.

Im Rahmen der STZ-Behandlung und der *high fat/ high sucrose* Diät wurde eine Akkumulation der LD induziert, die nicht nur im Verdacht steht, die Muskelkraft negativ zu beeinflussen, sondern auch eine mögliche Erklärung für die gemessene erhöhte Ermüdungsresistenz darstellen kann. In beiden diabetischen Versuchsgruppen dieser Arbeit wurde über PLIN5 als Surrogat-Parameter eine Erhöhung der intramuskulären LD nachgewiesen, wodurch vermehrt Lipide zur Verstoffwechslung vorhanden sind. Die Menge der LD in der Muskelzelle ist für eine normale Muskelfunktion von großer Bedeutung [2] und der intramuskuläre Fettspeicher ist zudem ein wichtiger Energielieferant während länger andauernder Muskelarbeit. [94],[83],[94]. In den im M. soleus prädominanten Typ I und Typ IIA Fasertypen [59] werden vermehrt Fettsäure-oxidierenden Enzyme exprimiert und auch Mitochondrien sind in einer höheren Anzahl zu finden, die mit einer langsameren Ermüdung assoziiert sind [62],[58],[66]. Zusätzlich konnte nach einer alleinigen HFD eine erhöhte Ermüdungsresistenz in Verbindung mit einer höheren oxidativen Enzymkapazität, einer erhöhten Mitochondrien-Anzahl, erhöhten LD und ATP-Spiegeln

nachgewiesen werden [82],[148],[63]. Da Fettsäuren ein natürlicher Ligand des PPAR α sind, kann darüber die Zunahme der Mitochondrien gesteuert werden [175] und darüber die oxidative Kapazität erhöht werden. Außerdem konnte in anderen Arbeiten nach HFD ebenso eine Zunahme der kurzkettigen Acyl-CoA-Dehydrogenase im M. soleus nachgewiesen werden, was auf eine vermehrte Verstoffwechslung von Lipiden zur Energiegewinnung hinweisen kann [148]. Auch erhöhte Fettsäure Spiegel können mit einer Induktion der Fettsäure-Oxidation und Verminderung der Glykolyse einhergehen. Weiterhin war auch die Konzentration der ATGL nach gesteigerter Fettsäurezufuhr erhöht [95]. Eine Erhöhung der PLIN5 Werte, wie sie bei Diabetes mellitus oder bei einem vermehrten Angebot an Fettsäuren zu finden ist [100],[160], ist mit einer erhöhten oxidativen Genexpression, einer erhöhten Metabolisierungsrate der Lipide und dadurch mit einer erhöhten oxidativen Kapazität assoziiert [84],[112]. Relevant für den Effekt von PLIN5 auf den Lipidstoffwechsel ist die Aktivität der PKA, die schlussfolgernd bei einem Diabetes mellitus hochreguliert ist, was dann über eine PKA assoziierte Phosphorylierung von PLIN5 zu einer Aktivierung der ATGL und dadurch zu einer Erhöhung der Lipolyse führt [100],[224],[95],[113],[98]. Zusätzlich wird durch eine Aktivierung der PKA auch die Hormonsensitive Lipase phosphoryliert und damit aktiviert, was die Fettsäureverwertung ebenso fördert [224].

In Zusammenschau ergeben sich also Hinweise auf eine erhöhte Verstoffwechslung der vermehrten intramuskulären Lipide zur ATP-Synthese durch eine gesteigerte oxidative Kapazität in der diabetischen Muskelzelle während der repetitiven Reizung, was in Assoziation mit der beobachteten PLIN5 Erhöhung die erhöhte Ermüdungsresistenz möglicherweise erklären kann. In der bisherigen Forschung wurde bei Überexpression von PLIN2 [118], Diabetes mellitus Typ II und Insulinresistenz zum Teil auch eine reduzierte oxidative Kapazität beschrieben [172],[170], PLIN5 hingegen führt zu einer Erhöhung der oxidativen Kapazität [112],[114],[84], sodass möglicherweise der erhöhende Effekt des vermehrt exprimierten PLIN5 auf die oxidative Kapazität überwiegt. Um die Rolle dieses potenziellen Mechanismus aufzuklären, sollten in Zukunft die Marker für die oxidative Kapazität sowie die Phosphorylierung der Proteinkinase A, der ATGL, der Hormonsensitiven Lipase, von PLIN5 und von CGI-58 analysiert werden. Hinweise für eine vermehrte Substratoxidation der Lipide, ergeben sich auch in dieser Arbeit. In der STZ-Versuchsgruppe fällt auf, dass die Anzahl der LD in Relation zum prozentuale PLIN2 Anteil deutlich erhöht ist, sodass schlussfolgernd mehr, aber kleinere LD vorliegen. Dies korreliert mit dem erhöhten Nachweis von PLIN5, was unter Bedingungen der aktivierten PKA zu einer erhöhten Aktivierung der ATGL führen kann [98],[99],[100],[224]. In der DIOSTZ Gruppe waren sowohl Anzahl als auch prozentualer Anteil von PLIN2 beziehungsweise 5 deutlich erhöht, sodass hier allein dadurch keine Aussage über die Größe der LD getroffen werden kann. Die Frage nach der tatsächlichen Größe der LD bleibt in dieser Arbeit unbeantwortet, weshalb elektronenmikroskopische Analysen sinnvoll sein können. Eine weitere gemeinsame Eigenschaft, die sowohl die DIOSTZ- und STZ- behandelten Mäuse der hier vorliegenden Arbeit als auch Mäuse mit alleiniger HFD gemein haben, ist ein erhöhter Blutzuckerwert, was somit ebenfalls eine Erklärung für die langsamere Ermüdung darstellen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit bleibt dies jedoch unbeantwortet.

4.5 Muskelfasertypen Verteilung

Der M. soleus der gesunden Maus besteht nahezu zur Hälfte aus Typ I und Typ IIA Muskelfasern und nur zu einem geringen Anteil aus Typ IIB Fasern [59],[86]. Die Ergebnisse der Fasertypen Analyse in der Kontrollgruppe zeigte im Vergleich zur Literatur [59],[58] einen höheren Anteil Typ IIB Fasern mit 10,39%, was jedoch auch in einer Arbeit von Ciapaite et al beobachtet wurde [129]. Die Verteilung der Muskelfasertypen kann durch viele Einflüsse verändert werden, beispielhaft sind hier Alter, Geschlecht und Bewegung zu nennen [59]. Aber auch durch eine HFD kommt es im Mausmodell vor allem in den langsamen M. soleus zu einem Wechsel der schweren Ketten im Myosin [86]. Der erhöhte Anteil an Typ IIB Fasern in den Kontrollmäusen kann möglicherweise durch das Bewegungsverhalten der Versuchstiere in den Käfigen erklärt werden oder aber ein Stichprobenartefakt darstellen.

4.5.1 Einfluss der STZ-Behandlung auf die Verteilung der Muskelfasertypen und die Ermüdungsresistenz

Es finden sich mehrere Hinweise auf einen Einfluss der diabetischen Stoffwechsellaage auf die Zusammensetzung der Muskelfasertypen. Eine Veränderung der Muskelfasertypen nach STZ- Behandlung und Diabetes Mellitus Typ I Induktion findet sich vor allem in den schnelleren Muskelgruppe wie z.B. dem EDL (hauptsächlich Typ IIA, IIB) und weniger in den langsamen Muskelgruppen wie dem M. soleus (hauptsächlich Typ I und IIA). Dabei gibt es Hinweise darauf, dass die schnellen glykolytischen Fasern im Vergleich zu den langsameren Muskelfasertypen durch die STZ-Behandlung eine stärkere Abnahme der physiologischen Muskelfunktion zeigen [169],[188] [225],[149],[168]. Dies lässt den Schluss zu, dass STZ vor allem die schnellen glykolytischen Fasern (Typ IIB) beeinträchtigt und die langsameren oxidativen Fasern (Typ I) beziehungsweise der intermediäre Typ IIA weniger einer Veränderung durch STZ unterliegen. In den durch die STZ-Behandlung geschädigten Muskelfasern lassen sich mehrere Anzeichen für eine Schädigung finden, wie Zeichen der Denervation, Degeneration und Nekrose. Zusätzlich findet man eine vermehrte Fetteinlagerung (vor allem in Typ IIA) und die Lokalisation der Mitochondrien in der Zelle verschiebt sich hin zu einer subsarkolemmalen Position. Aber auch Zeichen der Regeneration können festgestellt werden, die in gesunden Muskeln nicht in dieser Häufigkeit zu finden sind [188]. Auch die motorische Endplatte ist von einer Degeneration betroffen, wobei es jedoch auch Zeichen eines Remodelings der motorischen Endplatten gibt, die als Zeichen einer Reinnervation gedeutet wurden. Kommt es nicht zu einer Regeneration der motorischen Endplatte resultiert dies in Atrophie und Degeneration der Muskelfaser [188].

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich geringe und nicht signifikante Unterschiede in der Muskelfasertypen Verteilung zwischen STZ- und Kontrolltieren beobachtet. (Typ I +3,52%; Typ IIA - 0,9%; Typ IIB -2,623%). Passend zur stärkeren Funktionseinschränkung der schnellen glykolytischen Fasern kommt es hier zu einer geringfügigen Abnahme der Typ IIB Fasern im STZ-Tiermodell. Zudem scheinen die Veränderungen erst sieben bis acht Wochen nach Behandlung mit STZ aufzutreten [149],[188],[168]. In der vorliegenden Arbeit betrug der Zeitraum zwischen STZ- Behandlung und Analyse der Muskulatur sechs Wochen, was ein Grund für die geringen und nicht signifikanten Veränderungen in der Muskelfasertypen Verteilung der STZ-Tiere im Vergleich zur Kontrolle sein könnte.

In Bezug auf die Ermüdungsresistenz können die geringen, nicht signifikanten Veränderungen folgendermaßen interpretiert werden. Obwohl in der STZ- Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Veränderungen der Muskelfasertypen Verteilung festgestellt werden konnte, wurde eine erhöhte Ermüdungsresistenz nachgewiesen. Dies lässt daher den Einfluss einer veränderten Fasertypen- Zusammensetzung im M. soleus auf die Ermüdung der Muskelpräparate fraglich erscheinen.

4.5.2 Einfluss der DIOSTZ-Behandlung auf die Verteilung der Muskelfasertypen und die Ermüdungsresistenz

In der DIOSTZ Versuchsgruppe ließen sich signifikante Veränderungen in der Muskelfasertypenverteilung (I: -5,2% IIA: +10,8 % IIB: - 5,6%) im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Dabei kam es zu einer Abnahme der, im Vergleich zu Typ II Fasern, langsamer ermüdenden Typ I Fasern [61],[58],[62]. Die Ermüdungsresistenz hängt aber auch von der oxidativen Kapazität der Muskulatur ab, die mit dem Mitochondrien Gehalt in den Muskelfasertypen korreliert und in den Typ IIA Fasern am größten ist [63]. Daher kann die Zunahme der Typ IIA Muskelfasern zur Ermüdungsresistenz der DIOSTZ-Tiere beitragen. Dass aber trotz der Abnahme der oxidativen und ebenso ermüdungsresistenten Typ I Fasern eine langsamere Ermüdung in der DIOSTZ Versuchstiergruppe nachgewiesen wurde, wird als starker Beleg für den Effekt der LD auf die Ermüdungsresistenz interpretiert.

Es finden sich Hinweise darauf, dass eine Insulinresistenz ursächlich für eine Abnahme der Typ I und eine Zunahme der Typ II Muskelfasern sein kann [141],[86]. Dies kann erklären, warum es in der STZ-Versuchsgruppe zu keiner signifikanten Veränderung der Muskelfasertypenverteilung kam, in der DIOSTZ- Versuchsgruppe mit Insulinresistenz hingegen schon. Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass die *high fat/high sucrose* Fütterung eine Insulinresistenz induzieren kann [207]. Dabei ist davon auszugehen, dass die HFD der DIOSTZ-Mäuse über eine chronische Inflammation und die Akkumulation von intramuskulärem Fett eine Insulinresistenz induziert, was zusammen mit den erhöhten Blutfettwerten Bedingungen eines Diabetes mellitus Typ II in der Maus erzeugt [82], (vgl Kapitel 1.8.2). Auch in anderen Untersuchungen konnte wie in dieser Arbeit bei Diabetes mellitus Typ II eine Abnahme der Typ I und eine Zunahme der Typ II Muskelfasern festgestellt werden [226],[227],[218],[228].

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Abnahme der Typ I Muskelfasern im Diabetes mellitus Typ II Mausmodell kann die erniedrigte Expression von PGC-1 α bei Insulinresistenz sein, welches auch an einer Veränderung der Muskelfasertypen beteiligt ist. Obwohl es bei alleiniger HFD zu erhöhten PGC-1 α Spiegel kommt [82],[129], sind Diabetes mellitus Typ II und Insulinresistenz mit einer Reduktion der PGC1- α Expression assoziiert (ca. -20%) [170],[171],[172]. PGC-1 α wird vor allem in Muskelfasern vom Typ I exprimiert, die ihre Energie vor allem über oxidativen Stoffwechsel in Mitochondrien gewinnen [174]. Dabei führt PGC-1 α (vgl. Kapitel 1.8.2) zu einer Aktivierung der Substratoxidation und zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Myocyte enhancer factor 2* zu einer vermehrten Expression von Proteinen, die vor allem in Typ I Muskelfasern exprimiert werden [174]. Weiterhin soll PGC-1 α zusammen mit dem Calcineurin Signalweg eine wichtige Rolle in der Transformation zu oxidativen Muskelfasertypen spielen [174]. Die verminderte Expression von PGC-1 α bei Insulinresistenz kann die Abnahme der Typ I Muskelfasern im DIOSTZ Mausmodell im Vergleich zur Kontrollgruppe möglicherweise plausibel erklären. PGC-1 α wird außerdem auch durch Insulin induziert [174],[173], was bei STZ vermitteltem Insulinmangel vermindert geschieht, sodass eine Addition der Insulinresistenz und des Insulinmangels möglicherweise zu einer relevanten Abnahme von PGC-1 α mit einer Auswirkung auf die Expression der Muskelfasertypen führt. Um diese Hypothese zu bestätigen ist es sinnvoll die PGC-1 α Expression im DIOSTZ- sowie STZ-Mausmodell zu untersuchen und mit der veränderten Verteilung der Muskelfasern mit Bezug zu Kontrollgruppe zu korrelieren.

Interessanterweise konnte nach kurzer Dauer der HFD (5 bzw. 12 Wochen) in anderen Studien keine Veränderung der Expression von PGC-1 α und gemäß der soeben aufgestellten Hypothese auch keine Veränderung der Myosin Schwere Ketten Isoformen im M. soleus nachgewiesen werden [129],[148]. Umek et al hingegen verlängerten den Zeitraum der HFD auf über 26 Wochen und beobachteten im M. soleus Veränderungen in der Muskelfasertypenverteilung. So kam es zu einer Abnahme der langsamen Myosin Schwere Ketten Isoform und einer Zunahme der schnellen Isoformen [86]. Dies unterstreicht den möglichen Einfluss einer Insulinresistenz auf die Muskelfasertypen Verteilung, denn über einen erhöhten intramuskulären Lipidgehalt im Rahmen einer HFD beziehungsweise bei Diabetes mellitus kann es vor allem durch Ceramide und Diacylglycerol zu einer Insulinresistenz kommen [85],[86]. Über die Insulinresistenz kommt es zu einer Abnahme der insulinsensitiven Typ I Fasern und zu einer Zunahme der Typ II Fasern [141]. Weiterhin publizierten Stuart et al, dass in den Typ I Muskelfasern der Insulinsignalweg verändert war [141]. Bringt man dies mit der Erkenntnis zusammen, dass der Muskel Insulin zum Wachsen benötigt [147], kann dies ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten Veränderungen der Muskelfasertypen Verteilung in der vorliegenden Arbeit sein.

4.6 Limitationen

Bedingt durch das Mausmodell ergeben sich Limitationen, die nachfolgend diskutiert werden.

Hier ist zuallererst zu nennen, dass das hier verwendete Mausmodell eine gute Näherung an die Bedingungen im menschlichen Organismus liefert, jedoch immer speziesspezifische Unterschiede zu erwarten sind und somit die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind. Dabei weist beispielsweise in der Spezies Maus der Muskelfasertyp IIA die höchste oxidative Kapazität auf, im Menschen dagegen die Muskelfasern vom Typ I, sodass die Überlegungen und Ergebnisse der Ermüdungsmessung nicht unmittelbar auf den Menschen übertragbar sind. Erschwerend kommt hinzu, dass der menschliche M. soleus mit 80% Typ I Fasern eine andere Verteilung als der M. Soleus der Maus aufweist [229],[59],[86],[129]. Zusätzlich bleibt anzumerken, dass die Untersuchung von intakten Muskelpräparaten in vitro die Komplexität der Muskulatur mit seiner Nerven - und Gefäßversorgung nicht nachbilden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche Mäuse untersucht und damit periodische Schwankungen der weiblichen Geschlechtshormone limitierend nicht berücksichtigt. Es ist davon auszugehen, dass die Ausprägung der HFD- und STZ- vermittelten Phänotypen in weiblichen und männlichen Tieren unterschiedlich ist, weshalb zukünftige Studien auch weibliche Tiere mit einbeziehen sollten. Außerdem ist die Stichprobengröße in der immunhistochemischen Analyse in der Kontroll- und STZ-Tiergruppe zu gering und damit nicht ausreichend für eine valide statistische Analyse, was die Aussagekraft aufgrund eines potenziellen Stichprobenfehlers abschwächt. Eine größere Stichprobe wäre im Hinblick auf statistische Signifikanz wünschenswert gewesen. Zudem konnte in dieser Arbeit keine Vergleichsgruppe mit einer alleinigen HFD untersucht werden.

Aufgrund der Plastizität des Muskelgewebes kann durch viele Faktoren ein Umbau des Gewebes ausgelöst werden. Dies bedingt eine Heterogenität des Skelettmuskelgewebes; allein dadurch kann es zu Unterschieden zwischen Muskelgruppen oder unterschiedlichen Spezies kommen. Unter anderem, deswegen sind die Ergebnisse anderer Forschungslabore nicht unmittelbar miteinander vergleichbar, was die Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext erschwert.

Betrachtet man den chronischen Charakter der Diabetes mellitus Erkrankung, gilt es die Lebenserwartung der Mäuse im Vergleich zum Menschen zu beachten. Die maximale Lebenserwartung des Menschen wird mit 120 Jahren angegeben, wohingegen die Lebenserwartung einer Maus maximal vier Jahre beträgt [230]. Berechnung zu Folge entspricht ein Lebensjahr beim Menschen 2,6 Tage Lebenszeit der Maus in der Erwachsenenperiode. Damit entspricht das Alter der Versuchstiere dieser Arbeit beim Menschen 53,84 Jahre. Alle diabetischen Versuchstiere wurden in der 14. Lebenswoche mit STZ behandelt, sodass die Zeitspanne der diabetischen Stoffwechsellage umgerechnet auf die Lebensspanne des Menschen 16,2 betrug [230]. Da Diabetes mellitus Typ I meist in frühem Alter auftritt, ist diese kalkulierte Zeitspanne kürzer als die tatsächliche Erkrankungsdauer des Menschen. Bezogen auf Typ II, der meist eher im mittleren Erwachsenenalter auftritt, kommt die kalkulierte Zeitspanne näher an die tatsächliche Erkrankungsdauer im Menschen heran (vgl. Kapitel 1.7.2). Weiterhin gilt es zu bedenken, dass Menschen in der westlichen Welt, oft ausreichend Zugang zur Behandlung mit Insulin und Antidiabetika haben, sodass nach Diagnose oft mit der Behandlung des Diabetes mellitus begonnen wird. Die Versuchstiere bekommen keine Insulinbehandlung, damit besteht in den Versuchstieren über längere Zeit ein höherer Blutzuckerwert im Vergleich zum behandelten Diabetiker. Dies muss bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf die Übertragbarkeit auf den Menschen bedacht werden.

In Bezug auf die Ermüdungsmessung finden sich bei der differenzierten Analyse der bisherigen Forschung relevante Einflüsse auf die Ermüdungsreaktion durch die Art der Erzeugung der diabetischen Modellerkrankungen [200], durch die Zusammensetzung der HFD und durch das Protokoll bei der

Durchführung der Ermüdungsmessung [82],[231]. Schlussfolgernd sind verschiedene Mausmodelle und andere Studien untereinander nur bedingt vergleichbar, was dadurch eine Limitation bei der Interpretation der Ergebnisse darstellt. Es bleibt außerdem anzuführen, dass die Färbung von Typ IIB nicht wie gewünscht funktionierte, was auf ein Problem mit dem primären Antikörper zurückgeführt wird. Daher wurden die ungefärbten Muskelfasern als Typ IIB gewertet, was eine potenzielle Fehlerquelle darstellen kann und bei der Interpretation der Daten bedacht werden muss.

Abschließend kann als Limitierung angefügt werden, dass zur Muskelfasertypen Bestimmung Querschnitte angefertigt wurden, aber die Expression der schweren Myosinketten Isoformen nicht zwangsläufig uniform entlang einer einzelnen Muskelfaser ist. So ist nachgewiesen worden, dass während Regeneration oder Transformation entlang einer Faser unterschiedliche Myosin Isoformen exprimiert werden können [232]. Um eine Verzerrung der Ergebnisse hierdurch zu vermeiden, wurden möglichst Schnitte aus dem Muskelbauch angefertigt mit einigen μm Abstand.

4.7 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen einer LD-Akkumulation im Skelettmuskulatur auf die Muskelfunktion zu analysieren. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass die kombinierte Behandlung aus STZ und *high fat/high sucrose* Futter im Sinne eines *proof of concept* geeignet ist eine deutliche LD-Akkumulation zu erzeugen. Weiter konnten differierende Auswirkungen einer diabetischen Modellerkrankung sowie der damit assoziierten Zunahme der LD auf Muskelfunktion nachgewiesen werden. Im Rahmen der Kraftmessung konnte ein deutlicher Kraftverlust der maximalen tetanischen Kraft im Diabetes mellitus Typ II Mausmodell nachgewiesen werden und mit einer deutlichen Akkumulation der LD assoziiert werden, sodass damit die initiale Hypothese einer negativen Auswirkung der intramuskulären LD-Akkumulation auf die Muskelkraft bestätigt werden konnte. Auch die Frage nach einer Titin Veränderung im diabetischen Mausmodell konnte im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden. Durch die reduzierte passive Steifigkeit des Titins im diabetischen Mausmodell kann die LDA beeinträchtigt sein, was möglicherweise zum Kraftverlust beiträgt. Die Verringerung der Steifigkeit des Titins sowie die intramuskuläre Akkumulation von LD sind zwei Mechanismen, die jedoch nicht isoliert betrachtet werden können, sondern pathophysiologisch durchaus gemeinsam die reduzierte Muskelkraft der DIOSTZ Versuchstiere im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen erklären können. Die Ergebnisse dieser Arbeit und eine Literaturrecherche zeigen, dass bisher viele pathophysiologische Mechanismen der diabetischen Myopathie unverstanden sind. Vor allem in Bezug auf die Größe und die intramuskuläre Menge der LD ergibt sich somit in Zukunft weiterer Forschungsbedarf zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen zur Erklärung der Abnahme der Muskelkraft. Es ergibt sich aus dieser Arbeit weiterhin die Fragestellung nach der metabolischen Auswirkung einer veränderten Perilipin Expression auf die Muskelfunktion. Denn im Rahmen einer Ermüdungsmessung wurde eine langsamere Ermüdung der diabetischen Muskelpräparate festgestellt, die nicht durch Veränderungen der Muskelfasertypen Zusammensetzung erklärt werden konnte, jedoch möglicherweise durch eine veränderte PLIN-Expression erklärt werden kann.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Frontera WR, Ochala J (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 96:183–195
- [2] Kim KH, Jia Z, Snyder M, Chen J, Qiu J, Oprescu SN, Chen X, Syed SA, Yue F, Roseguini BT, Imbalzano AN, Hu C et al. (2023) PRMT5 links lipid metabolism to contractile function of skeletal muscles. *EMBO Rep* 24:e57306
- [3] Welsch U, Kummer W, Deller T (Hrsg) (2022) *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch*. Elsevier: München
- [4] Wang Z, Grange M, Wagner T, Kho AL, Gautel M, Raunser S (2021) The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. *Cell* 184:2135–2150.e13
- [5] Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J (2020) *Duale Reihe Anatomie*. Thieme: Stuttgart
- [6] Citation & Sharing - Servier Medical Art (21.02.2024) (Zugriff vom 02.04.2024). <https://smart.servier.com/citation-sharing/>
- [7] HANSON J, HUXLEY HE (1953) Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* 172:530–532
- [8] HUXLEY HE, HANSON J (1959) The structural basis of the contraction mechanism in striated muscle. *Ann N Y Acad Sci* 81:403–408
- [9] Skeletal Muscle - Anatomy and Physiology | OpenStax (25.4. 2013) (Zugriff vom 02.04.2024). <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/10-2-skeletal-muscle>
- [10] Rall JA (2018) What makes skeletal muscle striated? Discoveries in the endosarcomeric and exosarcomeric cytoskeleton. *Adv Physiol Educ* 42:672–684
- [11] HUXLEY H, HANSON J (1954) Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature* 173:973–976
- [12] Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (2023) *Physiologie*. Thieme: Stuttgart
- [13] Garcia-Pelagio KP, Bloch RJ (2021) Biomechanical Properties of the Sarcolemma and Costameres of Skeletal Muscle Lacking Desmin. *Front Physiol* 12:706806
- [14] Jaka O, Casas-Fraile L, López de Munain A, Sáenz A (2015) Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Rev Mol Med* 17:e12
- [15] Trimarchi F, Favalaro A, Fulle S, Magaudo L, Puglielli C, Di Mauro D (2006) Culture of human skeletal muscle myoblasts: timing appearance and localization of dystrophin-glycoprotein complex and vinculin-talin-integrin complex. *Cells Tissues Organs* 183:87–98
- [16] Anastasi G, Amato A, Tarone G, Vita G, Monici MC, Magaudo L, Brancaccio M, Sidoti A, Trimarchi F, Favalaro A, Cutroneo G (2003) Distribution and localization of vinculin-talin-integrin system and dystrophin-glycoprotein complex in human skeletal muscle. Immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Cells Tissues Organs* 175:151–164
- [17] REZVANI M, ORNATSKY OI, CONNOR MK, EISENBERG HA, HOOD DA (1996) Dystrophin, vinculin, and aciculin in skeletal muscle subject to chronic use and disuse. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 28
- [18] Jayasinghe I, Launikonis BS (2013) Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle. *J Cell Sci* 126:4048–4058
- [19] Huang CL-H, Pedersen TH, Fraser JA (2011) Reciprocal dihydropyridine and ryanodine receptor interactions in skeletal muscle activation. *J Muscle Res Cell Motil* 32:171–202
- [20] Dominguez R, Holmes KC (2011) Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 40:169–186
- [21] Fujii T, Iwane AH, Yanagida T, Namba K (2010) Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* 467:724–728

- [22] Bottinelli R, Reggiani C (2000) Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 73:195–262
- [23] Linke WA (2023) Stretching the story of titin and muscle function. *J Biomech* 152:111553
- [24] Fürst DO, Nave R, Osborn M, Weber K (1989) Repetitive titin epitopes with a 42 nm spacing coincide in relative position with known A band striations also identified by major myosin-associated proteins. An immunoelectron-microscopical study on myofibrils. *J Cell Sci* 94 (Pt 1):119–125
- [25] Maruyama K, Yoshioka T, Higuchi H, Ohashi K, Kimura S, Natori R (1985) Connectin filaments link thick filaments and Z lines in frog skeletal muscle as revealed by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 101:2167–2172
- [26] Itoh Y, Suzuki T, Kimura S, Ohashi K, Higuchi H, Sawada H, Shimizu T, Shibata M, Maruyama K (1988) Extensible and less-extensible domains of connectin filaments in stretched vertebrate skeletal muscle sarcomeres as detected by immunofluorescence and immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. *J Biochem* 104:504–508
- [27] Trombitás K, Baatsen PH, Kellermayer MS, Pollack GH (1991) Nature and origin of gap filaments in striated muscle. *J Cell Sci* 100 (Pt 4):809–814
- [28] Higuchi H, Suzuki T, Kimura S, Yoshioka T, Maruyama K, Umazume Y (1992) Localization and elasticity of connectin (titin) filaments in skinned frog muscle fibres subjected to partial depolymerization of thick filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 13:285–294
- [29] Funatsu T, Higuchi H, Ishiwata S (1990) Elastic filaments in skeletal muscle revealed by selective removal of thin filaments with plasma gelsolin. *J Cell Biol* 110:53–62
- [30] Krüger M, Linke WA (2011) The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem* 286:9905–9912
- [31] Goll CM, Pastore A, Nilges M (1998) The three-dimensional structure of a type I module from titin: a prototype of intracellular fibronectin type III domains. *Structure* 6:1291–1302
- [32] Improta S, Politou AS, Pastore A (1996) Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure* 4:323–337
- [33] Freiburg A, Trombitás K, Hell W, Cazorla O, Fougère F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S (2000) Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* 86:1114–1121
- [34] Trombitás K, Pollack GH, Wright J, Wang K (1993) Elastic properties of titin filaments demonstrated using a "freeze-break" technique. *Cell Motil Cytoskeleton* 24:274–283
- [35] Labeit S, Kolmerer B Titins: Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity 1995. DOI: 10.1126/science.270.5234.293. *Science* (New York, N.Y.) 1995:S. 293-296
- [36] Skeie GO (2000) Skeletal muscle titin: physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 57:1570–1576
- [37] Helmes M, Trombitás K, Centner T, Kellermayer M, Labeit S, Linke WA, Granzier H (1999) Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circ Res* 84:1339–1352
- [38] Trombitás K, Greaser M, Labeit S, Jin JP, Kellermayer M, Helmes M, Granzier H (1998) Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol* 140:853–859
- [39] Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B (1998) Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8052–8057
- [40] Linke WA, Stockmeier MR, Ivemeyer M, Hosser H, Mundel P (1998) Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *J Cell Sci* 111 (Pt 11):1567–1574
- [41] Hooke'sches Gesetz - Mechanische Energie einfach erklärt! (19.11.2024) (Zugriff vom 19.11.2024). <https://learnattack.de/schuelerlexikon/physik/hookesches-gesetz>

- [42] Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Rüegg JC, Labeit S (1996) Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *Journal of Molecular Biology* 261:62–71
- [43] Rivas-Pardo JA, Li Y, Mártonfalvi Z, Tapia-Rojó R, Unger A, Fernández-Trasancos Á, Herrero-Galán E, Velázquez-Carreras D, Fernández JM, Linke WA, Alegre-Cebollada J (2020) A HaloTag-TEV genetic cassette for mechanical phenotyping of proteins from tissues. *Nat Commun* 11:2060
- [44] Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA (2009) Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 104:87–94
- [45] Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H (2009) PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 105:631-8, 17 p following 638
- [46] Singh RK, Kumar S, Gautam PK, Tomar MS, Verma PK, Singh SP, Acharya A (2017) Protein kinase C- α and the regulation of diverse cell responses. *Biomol Concepts* 8:143–153
- [47] Farese RV (2001) Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. *Exp Biol Med* (Maywood) 226:283–295
- [48] Choudhary V, Golani G, Joshi AS, Cottier S, Schneider R, Prinz WA, Kozlov MM (2018) Architecture of Lipid Droplets in Endoplasmic Reticulum Is Determined by Phospholipid Intrinsic Curvature. *Curr Biol* 28:915-926.e9
- [49] Labeit D, Watanabe K, Witt C, Fujita H, Wu Y, Lahmers S, Funck T, Labeit S, Granzier H (2003) Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13716–13721
- [50] Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* (New York, N.Y.) 261:58–65
- [51] Craig R, Lehman W (2001) Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments¹¹Edited by W. Baumeister. *Journal of Molecular Biology* 311:1027–1036
- [52] Lehman W, Craig R (2008) Tropomyosin and the steric mechanism of muscle regulation. *Adv Exp Med Biol* 644:95–109
- [53] Xu C, Craig R, Tobacman L, Horowitz R, Lehman W (1999) Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophys J* 77:985–992
- [54] Vibert P, Craig R, Lehman W (1997) Steric-model for activation of muscle thin filaments. *Journal of Molecular Biology* 266:8–14
- [55] K. D. Wu, W. S. Lee, J. Wey, D. Bungard, and J. Lytton (1995) Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase isoform transcripts. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.3.C775>. *Am J Physiol Cell Physiol*
- [56] Eshima H (2021) Influence of Obesity and Type 2 Diabetes on Calcium Handling by Skeletal Muscle: Spotlight on the Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Front Physiol* 12:758316
- [57] Gunter TE, Pfeiffer DR (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258:C755-86
- [58] Schiaffino S, Reggiani C (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91:1447–1531
- [59] Hämmäläinen N, Pette D (1995) Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. *Microsc Res Tech* 30:381–389
- [60] Gollnick PD, Matoba H (1984) The muscle fiber composition of skeletal muscle as a predictor of athletic success. An overview. *Am J Sports Med* 12:212–217
- [61] Edström L, Kugelberg E (1968) Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31:424–433
- [62] Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J et al. (2017) *Physiologie*. Thieme: Stuttgart

- [63] Delp MD, 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* 80:261–270
- [64] Bárány M (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50:Suppl:197–218
- [65] BARANY M, BARANY K, RECKARD T, VOLPE A (1965) MYOSIN OF FAST AND SLOW MUSCLES OF THE RABBIT. *Arch Biochem Biophys* 109:185–191
- [66] Komiya Y, Sawano S, Mashima D, Ichitsubo R, Nakamura M, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Mizunoya W (2017) Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis. *J Muscle Res Cell Motil* 38:163–173
- [67] Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184:170–192
- [68] MacDougall KB, Devrome AN, Kristensen AM, MacIntosh BR (2020) Force-frequency relationship during fatiguing contractions of rat medial gastrocnemius muscle. *Sci Rep* 10:11575
- [69] Fukutani A, Westerblad H, Jardemark K, Bruton J (2024) Ca²⁺ and force during dynamic contractions in mouse intact skeletal muscle fibers. *Sci Rep* 14
- [70] Allen DG, Lee JA, Westerblad H (1989) Intracellular calcium and tension during fatigue in isolated single muscle fibres from *Xenopus laevis*. *J Physiol* 415:433–458
- [71] Levine RJ, Kensler RW, Yang Z, Stull JT, Sweeney HL (1996) Myosin light chain phosphorylation affects the structure of rabbit skeletal muscle thick filaments. *Biophys J* 71:898–907
- [72] Sweeney HL, Bowman BF, Stull JT (1993) Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am J Physiol* 264:C1085–95
- [73] MacIntosh BR (2010) Cellular and whole muscle studies of activity dependent potentiation. *Adv Exp Med Biol* 682:315–342
- [74] Helmes M, Trombitas K, Henk G Titin Develops Restoring Force in Rat Cardiac Myocytes. *Circ Res* 1996
- [75] Mateja RD, Greaser ML, Tombe PP de (2013) Impact of titin isoform on length dependent activation and cross-bridge cycling kinetics in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1833:804–811
- [76] Hessel AL, Ma W, Mazara N, Rice PE, Nissen D, Gong H, Kuehn M, Irving T, Linke WA (2022) Titin force in muscle cells alters lattice order, thick and thin filament protein formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:e2209441119
- [77] Irving T, Wu Y, Bekyarova T, Farman GP, Fukuda N, Granzier H (2011) Thick-filament strain and interfilament spacing in passive muscle: effect of titin-based passive tension. *Biophys J* 100:1499–1508
- [78] Tombe PP de, Mateja RD, Tachampa K, Ait Mou Y, Farman GP, Irving TC (2010) Myofilament length dependent activation. *J Mol Cell Cardiol* 48:851–858
- [79] Rassier DE, Macintosh BR (2000) Coexistence of potentiation and fatigue in skeletal muscle. *Braz J Med Biol Res* 33:499–508
- [80] Ament W, Verkerke GJ (2009) Exercise and fatigue. *Sports Med* 39:389–422
- [81] Armstrong RB, Laughlin MH (1983) Blood flows within and among rat muscles as a function of time during high speed treadmill exercise. *J Physiol* 344:189–208
- [82] Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Kakigi R, Kawamori R, Watada H (2021) Maintenance of contractile force and increased fatigue resistance in slow-twitch skeletal muscle of mice fed a high-fat diet. *J Appl Physiol* (1985) 130:528–536
- [83] Hargreaves M, Spriet LL (2020) Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat Metab* 2:817–828
- [84] Bosma M (2016) Lipid droplet dynamics in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 340:180–186
- [85] van Loon LJC, Goodpaster BH (2006) Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* 451:606–616

- [86] Umek N, Horvat S, Cvetko E (2021) Skeletal muscle and fiber type-specific intramyocellular lipid accumulation in obese mice. *Bosn J Basic Med Sci* 21:730–738
- [87] Thiam AR, Farese RV, Walther TC (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:775–786
- [88] Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277:44507–44512
- [89] Hsieh K, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR (2012) Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J Cell Sci* 125:4067–4076
- [90] Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, Kimmel AR (1995) Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* 23:611–615
- [91] Palomer X, Barroso E, Zarei M, Botteri G, Vázquez-Carrera M (2016) PPAR β/δ and lipid metabolism in the heart. *Biochim Biophys Acta* 1861
- [92] Montaigne D, Butruille L, Staels B (2021) PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat Rev Cardiol* 18:809–823
- [93] Nunes PM, van de Weijer T, Veltien A, Arnts H, Hesselink MKC, Glatz JFC, Schrauwen P, Tack CJ, Heerschap A (2012) Increased intramyocellular lipids but unaltered in vivo mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of adipose triglyceride lipase-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E71–81
- [94] van Loon LJC, Koopman R, Stegen JHCH, Wagenmakers AJM, Keizer HA, Saris WHM (2003) Intramyocellular lipids form an important substrate source during moderate intensity exercise in endurance-trained males in a fasted state. *J Physiol* 553:611–625
- [95] Turner MC, Rimington RP, Martin NRW, Fleming JW, Capel AJ, Hodson L, Lewis MP (2021) Physiological and pathophysiological concentrations of fatty acids induce lipid droplet accumulation and impair functional performance of tissue engineered skeletal muscle. *J Cell Physiol* 236:7033–7044
- [96] Kakehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S-I, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R et al. (2016) Increased intramyocellular lipid/impaired insulin sensitivity is associated with altered lipid metabolic genes in muscle of high responders to a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310:E32–40
- [97] Andrich DE, Ou Y, Melbouci L, Leduc-Gaudet J-P, Auclair N, Mercier J, Secco B, Tomaz LM, Gouspillou G, Danialou G, Comtois A-S, St-Pierre DH (2018) Altered Lipid Metabolism Impairs Skeletal Muscle Force in Young Rats Submitted to a Short-Term High-Fat Diet. *Front Physiol* 9:1327
- [98] Wang H, Bell M, Sreenivasan U, Sreenevasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, Londos C, Yamaguchi T, Rizzo MA, Coleman R, Gong D et al. (2011) Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem* 286:15707–15715
- [99] Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (New York, N.Y.)* 306:1383–1386
- [100] Zhang X, Xu W, Xu R, Wang Z, Zhang X, Wang P, Peng K, Li M, Li J, Tan Y, Wang X, Pei H (2022) Plin5 Bidirectionally Regulates Lipid Metabolism in Oxidative Tissues. *Oxid Med Cell Longev* 2022:4594956
- [101] Wang H, Hu L, Dalen K, Dorward H, Marcinkiewicz A, Russell D, Gong D, Londos C, Yamaguchi T, Holm C, Rizzo MA, Brasaemle D et al. (2009) Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem* 284:32116–32125

- [102] Li X, Li Z, Zhao M, Nie Y, Liu P, Zhu Y, Zhang X (2019) Skeletal Muscle Lipid Droplets and the Athlete's Paradox. *Cells* 8
- [103] Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE (2001) Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5755–5761
- [104] Almeida ME de, Ørtenblad N, Petersen MH, Schjerning A-SN, Wentorf EK, Jensen K, Højlund K, Nielsen J (2023) Acute exercise increases the contact between lipid droplets and mitochondria independently of obesity and type 2 diabetes. *J Physiol* 601:1797–1815
- [105] van Loon LJC (2004) Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *Journal of Applied Physiology* 97:1170–1187
- [106] Shaw CS, Jones DA, Wagenmakers AJM (2008) Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres. *Histochem Cell Biol* 129:65–72
- [107] Parry HA, Glancy B (2021) Energy transfer between the mitochondrial network and lipid droplets in insulin resistant skeletal muscle. *Curr Opin Physiol* 24
- [108] Lundsgaard A-M, Fritzen AM, Kiens B (2017) Exercise Physiology in Men and Women. In: Legato MJ (Hrsg) *Principles of gender-specific medicine. Gender in the genomic era*. Elsevier Academic Press: Amsterdam, 525–542
- [109] Rodríguez AM, Sánchez J, Tobaruela A, Priego T, Picó C, Palou A (2010) Time-course effects of increased fatty acid supply on the expression of genes involved in lipid/glucose metabolism in muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 25:337–346
- [110] Bindesbøll C, Berg O, Arntsen B, Nebb HI, Dalen KT (2013) Fatty acids regulate perilipin5 in muscle by activating PPAR δ . *J Lipid Res* 54:1949–1963
- [111] Bosma M, Sparks LM, Hooiveld GJ, Jorgensen JA, Houten SM, Schrauwen P, Kersten S, Hesselink MKC (2013) Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity. *Biochim Biophys Acta* 1831:844–852
- [112] Laurens C, Bourlier V, Mairal A, Louche K, Badin P-M, Mouisel E, Montagner A, Marette A, Tremblay A, Weisnagel JS, Guillou H, Langin D et al. (2016) Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle. *Sci Rep* 6:38310
- [113] Bosma M, Kersten S, Hesselink MKC, Schrauwen P (2012) Re-evaluating lipotoxic triggers in skeletal muscle: relating intramyocellular lipid metabolism to insulin sensitivity. *Prog Lipid Res* 51:36–49
- [114] Gemmink A, Daemen S, Brouwers B, Huntjens PR, Schaart G, Moonen-Kornips E, Jörgensen J, Hoeks J, Schrauwen P, Hesselink MKC (2018) Dissociation of intramyocellular lipid storage and insulin resistance in trained athletes and type 2 diabetes patients; involvement of perilipin 5? *J Physiol* 596:857–868
- [115] Gemmink A, Daemen S, Brouwers B, Hoeks J, Schaart G, Knoop K, Schrauwen P, Hesselink MKC (2021) Decoration of myocellular lipid droplets with perilipins as a marker for in vivo lipid droplet dynamics: A super-resolution microscopy study in trained athletes and insulin resistant individuals. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1866:158852
- [116] Harris L-ALS, Skinner JR, Shew TM, Pietka TA, Abumrad NA, Wolins NE (2015) Perilipin 5-Driven Lipid Droplet Accumulation in Skeletal Muscle Stimulates the Expression of Fibroblast Growth Factor 21. *Diabetes* 64:2757–2768
- [117] Gemmink A, Daemen S, Kuijpers HJH, Schaart G, Duimel H, López-Iglesias C, van Zandvoort MAMJ, Knoop K, Hesselink MKC (2018) Super-resolution microscopy localizes perilipin 5 at lipid droplet-mitochondria interaction sites and at lipid droplets juxtaposing to perilipin 2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1863:1423–1432

- [118] Bosma M, Hesselink MKC, Sparks LM, Timmers S, Ferraz MJ, Mattijssen F, van Beurden D, Schaart G, Baets MH de, Verheyen FK, Kersten S, Schrauwen P (2012) Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels. *Diabetes* 61:2679–2690
- [119] Doncheva AI, Li Y, Khanal P, Hjorth M, Kolset SO, Norheim FA, Kimmel AR, Dalen KT (2023) Altered hepatic lipid droplet morphology and lipid metabolism in fasted Plin2-null mice. *J Lipid Res* 64:100461
- [120] (2014) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1:S81-90
- [121] (2022) American Diabetes Association :. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes- Standards of Medical Care in Diabetes-. *Diabetes Care* 45:S17-S38
- [122] Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaft Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes – Kurzfassung, Version 3.0
- [123] Diabetes (18.03.2024) (Zugriff vom 18.03.2024). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- [124] Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, Groop P-H, Handelsman Y, Insel RA, Mathieu C, McElvaine AT, Palmer JP et al. (2017) Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes* 66:241–255
- [125] Thema Diabetes (2024) (Zugriff vom 18.03.2024). <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/sw/diabetes?s=&p=1&n=1&nid=149902>
- [126] Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes – Langfassung. Version 3.0. 2023 [cited: 2024-03-19]. DOI: 10.6101/AZQ/000503. www.leitlinien.de/diabetes.
- [127] Rosenbauer J, Neu A, Rothe U, Seufert J, Holl RW (2019) Diabetestypen sind nicht auf Altersgruppen beschränkt: Typ-1-Diabetes bei Erwachsenen und Typ-2-Diabetes bei Kindern und Jugendlichen
- [128] Gregory GA, Robinson TIG, Linklater SE, Wang F, Colagiuri S, Beaufort C de, Donaghue KC, Magliano DJ, Maniam J, Orchard TJ, Rai P, Ogle GD (2022) Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 10:741–760
- [129] Ciapaite J, van den Berg SA, Houten SM, Nicolay K, van Dijk KW, Jeneson JA (2015) Fiber-type-specific sensitivities and phenotypic adaptations to dietary fat overload differentially impact fast-versus slow-twitch muscle contractile function in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 26:155–164
- [130] Tönnies T, Röckl S, Hoyer A, Heidemann C, Baumert J, Du Y, Scheidt-Nave C, Brinks R (2019) Projected number of people with diagnosed Type 2 diabetes in Germany in 2040. *Diabet Med* 36:1217–1225
- [131] Robert Koch Institut- diabetes surveillance (19.03.2024) (Zugriff vom 19.03.2024)
- [132] Cordell HJ, Todd JA (1995) Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet* 11:499–504
- [133] Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2:1279–1283
- [134] Tarn AC, Thomas JM, Dean BM, Ingram D, Schwarz G, Bottazzo GF, Gale EA (1988) Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1:845–850
- [135] S3 Leitlinie-Therapie-Typ-1-Diabetes_2023-09_1 AWMF
- [136] Dhatariya KK (2019) Defining and characterising diabetic ketoacidosis in adults. *Diabetes Res Clin Pract* 155:107797
- [137] Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340:925–929
- [138] Son J, Accili D (2023) Reversing pancreatic β -cell dedifferentiation in the treatment of type 2 diabetes. *Exp Mol Med* 55:1652–1658

- [139] CDC National Diabetes Statistics Report 2020 National Diabetes Statistics Report 2020. Estimates of diabetes and its burden in the United States.
- [140] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>
- [141] Stuart CA, McCurry MP, Marino A, South MA, Howell MEA, Layne AS, Ramsey MW, Stone MH (2013) Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 98:2027–2036
- [142] DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP (1981) The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30:1000–1007
- [143] Björnholm M, Zierath JR (2005) Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans* 33:354–357
- [144] Bassel-Duby R, Olson EN (2006) Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19–37
- [145] Bonen A, Tan MH, Watson-Wright WM (1981) Insulin binding and glucose uptake differences in rodent skeletal muscles. *Diabetes* 30:702–704
- [146] Albers PH, Pedersen AJT, Birk JB, Kristensen DE, Vind BF, Baba O, Nøhr J, Højlund K, Wojtaszewski JFP (2015) Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 64:485–497
- [147] Klueber KM, Feczko JD, Schmidt G, Watkins JB (1989) Skeletal muscle in the diabetic mouse: histochemical and morphometric analysis. *Anat Rec* 225:41–45
- [148] Shortreed KE, Krause MP, Huang JH, Dhanani D, Moradi J, Ceddia RB, Hawke TJ (2009) Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. *PLoS One* 4:e7293
- [149] Jerković R, Bosnar A, Jurisić-Erzen D, Azman J, Starcević-Klasan G, Peharec S, Coklo M (2009) The effects of long-term experimental diabetes mellitus type I on skeletal muscle regeneration capacity. *Coll Antropol* 33:1115–1119
- [150] Monaco CMF, Perry CGR, Hawke TJ (2017) Diabetic Myopathy: current molecular understanding of this novel neuromuscular disorder. *Curr Opin Neurol* 30:545–552
- [151] Song SH, McIntyre SS, Shah H, Veldhuis JD, Hayes PC, Butler PC (2000) Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4491–4499
- [152] Edgerton DS, Moore MC, Winnick JJ, Scott M, Farmer B, Naver H, Jeppesen CB, Madsen P, Kjeldsen TB, Nishimura E, Brand CL, Cherrington AD (2014) Changes in glucose and fat metabolism in response to the administration of a hepato-preferential insulin analog. *Diabetes* 63:3946–3954
- [153] Reske-Nielsen E, Harmsen A, Vorre P (1977) Ultrastructure of muscle biopsies in recent, short-term and long-term juvenile diabetes. *Acta Neurol Scand* 55:345–362
- [154] Andersen H, Gjerstad MD, Jakobsen J (2004) Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 27:2382–2385
- [155] Andersen H, Gadeberg PC, Brock B, Jakobsen J (1997) Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *Diabetologia* 40:1062–1069
- [156] Jakobsen J, Reske-Nielsen E (1986) Diffuse muscle fiber atrophy in newly diagnosed diabetes. *Clin Neuropathol* 5:73–77
- [157] Park SW, Goodpaster BH, Lee JS, Kuller LH, Boudreau R, Rekenire N de, Harris TB, Kritchevsky S, Tykavsky FA, Nevitt M, Cho Y, Newman AB (2009) Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32:1993–1997
- [158] Nair KS, Garrow JS, Ford C, Mahler RF, Halliday D (1983) Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man. *Diabetologia* 25:400–403

- [159] Workeneh B, Bajaj M (2013) The regulation of muscle protein turnover in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 45:2239–2244
- [160] Hecker M, Wagner AH (2018) Role of protein carbonylation in diabetes. *J Inherit Metab Dis* 41:29–38
- [161] Orlando G, Balducci S, Bazzucchi I, Pugliese G, Sacchetti M (2017) The impact of type 1 diabetes and diabetic polyneuropathy on muscle strength and fatigability. *Acta Diabetol* 54:543–550
- [162] Andersen H (1998) Muscular endurance in long-term IDDM patients. *Diabetes Care* 21:604–609
- [163] Andersen H, Poulsen PL, Mogensen CE, Jakobsen J (1996) Isokinetic Muscle Strength in Long-Term IDDM Patients in Relation to Diabetic Complications. *Diabetes* 45:440–445
- [164] Andersen H, Schmitz O, Nielsen S (2005) Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med* 22:1401–1407
- [165] B Saltin, M Houston, E Nygaard, T Graham, J Wahren (1979) Muscle Fiber Characteristics in Healthy Men and Patients with Juvenile Diabetes. DOI 10.2337/diab.28.1.s93:93–99
- [166] Karakelides H, Asmann YW, Bigelow ML, Short KR, Dhatariya K, Coenen-Schimke J, Kahl J, Mukhopadhyay D, Nair KS (2007) Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects. *Diabetes* 56:2683–2689
- [167] Mogensen M, Sahlin K, Fernström M, Glinborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, Højlund K (2007) Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56:1592–1599
- [168] Krause MP, Riddell MC, Gordon CS, Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ (2009) Diabetic myopathy differs between Ins2Akita+/- and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *J Appl Physiol* (1985) 106:1650–1659
- [169] Paulus SF, Grossie J (1983) Skeletal muscle in alloxan diabetes. A comparison of isometric contractions in fast and slow muscle. *Diabetes* 32:1035–1039
- [170] Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ et al. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267–273
- [171] Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB et al. (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466–8471
- [172] Lin J, Handschin C, Spiegelman BM (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1:361–370
- [173] Ling C, Poulsen P, Carlsson E, Ridderstråle M, Almgren P, Wojtaszewski J, Beck-Nielsen H, Groop L, Vaag A (2004) Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. *J Clin Invest* 114:1518–1526
- [174] Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R et al. (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797–801
- [175] Hancock CR, Han D-H, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, Holloszy JO (2008) High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7815–7820
- [176] Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Häring HU, Jacob S (2001) Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50:2579–2584

- [177] Garcia-Roves P, Huss JM, Han D-H, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E, Chen M, Holloszy JO (2007) Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10709–10713
- [178] Fachada V, Rahkila P, Fachada N, Turpeinen T, Kujala UM, Kainulainen H (2022) Enlarged PLIN5-uncoated lipid droplets in inner regions of skeletal muscle type II fibers associate with type 2 diabetes. *Acta Histochem* 124:151869
- [179] Olofsson S-O, Andersson L, Håversen L, Olsson C, Myhre S, Rutberg M, Mobini R, Li L, Lu E, Borén J, Boström P (2011) The formation of lipid droplets: possible role in the development of insulin resistance/type 2 diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85:215–218
- [180] Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, Fernandez-Rodriguez J, Ericson J, Nilsson T, Borén J, Olofsson S-O (2007) SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* 9:1286–1293
- [181] Almeida ME de, Nielsen J, Petersen MH, Wentorf EK, Pedersen NB, Jensen K, Højlund K, Ørtenblad N (2023) Altered intramuscular network of lipid droplets and mitochondria in type 2 diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol* 324:C39–C57
- [182] Furman BL (2015) Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol* 70:5.47.1–5.47.20
- [183] Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, Agrawal YO (2016) Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact* 244:49–63
- [184] Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216–226
- [185] Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN (2013) Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord* 12:60
- [186] Akinlade OM, Owoyele BV, Soladoye AO (2021) Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy. *Afr Health Sci* 21:719–727
- [187] Magalhães DA de, Kume WT, Correia FS, Queiroz TS, Allebrandt Neto EW, Santos MPD, Kawashita NH, França SA de (2019) High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc* 91:e20180314
- [188] Klueber KM, Feczko JD (1994) Ultrastructural, histochemical, and morphometric analysis of skeletal muscle in a murine model of type I diabetes. *Anat Rec* 239:18–34
- [189] striated_muscle_guide
- [190] MyoDynamics Muscle Strip System - 840MD (09.11.2023) (Zugriff vom 09.11.2023). <https://www.dmt.dk/muscle-system-840md.html>
- [191] Oishi PE, Cholsiripunlert S, Gong W, Baker AJ, Bernstein HS (2011) Myo-mechanical analysis of isolated skeletal muscle. *J Vis Exp*
- [192] Upchurch WJ, Iaizzo PA (2022) In vitro contractile studies within isolated tissue baths: Translational research from Visible Heart® Laboratories. *Exp Biol Med* (Maywood) 247:584–597
- [193] (Brooks & Faulkner Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J*
- [194] Kumar A, Accorsi A, Rhee Y, Girgenrath M (2015) Do's and don'ts in the preparation of muscle cryosections for histological analysis. *J Vis Exp*:e52793
- [195] Piña R, Santos-Díaz AI, Orta-Salazar E, Aguilar-Vazquez AR, Mantellero CA, Acosta-Galeana I, Estrada-Mondragon A, Prior-Gonzalez M, Martinez-Cruz JI, Rosas-Arellano A (2022) Ten Approaches That Improve Immunostaining: A Review of the Latest Advances for the Optimization of Immunofluorescence. *Int J Mol Sci* 23
- [196] Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254

- [197] Cleland WW (1964) Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups*. *Biochemistry* 3:480–482
- [198] Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G (2022) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg
- [199] Westermeier R (2019) Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. In: Gressner (Hrsg) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1910–1911
- [200] Eshima H, Poole DC, Kano Y (2014) In vivo calcium regulation in diabetic skeletal muscle. *Cell Calcium* 56:381–389
- [201] Kilari BP, Mudgil P, Azimullah S, Bansal N, Ojha S, Maqsood S (2021) Effect of camel milk protein hydrolysates against hyperglycemia, hyperlipidemia, and associated oxidative stress in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Journal of Dairy Science* 104:1304–1317
- [202] Okamoto T, Kanemoto N, Ohbuchi Y, Okano M, Fukui H, Sudo T (2008) Characterization of STZ-Induced Type 2 Diabetes in Zucker Fatty Rats. *Exp Anim* 57:335–345
- [203] Nandini HS, Naik PR (2019) Action of corilagin on hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 299:186–193
- [204] Johnston APW, Campbell JE, Found JG, Riddell MC, Hawke TJ (2007) Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C1033–40
- [205] Cotter M, Cameron NE, Lean DR, Robertson S (1989) Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles. *Q J Exp Physiol* 74:65–74
- [206] Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Kakigi R, Hashimoto R, Funai K, Kawamori R, Watada H (2020) A chronic high-fat diet exacerbates contractile dysfunction with impaired intracellular Ca²⁺ release capacity in the skeletal muscle of aged mice. *J Appl Physiol* (1985) 128:1153–1162
- [207] Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Kurebayashi N, Murayama T, Nakamura K, Kakigi R, Okada T, Sakurai T, Kawamori R, Watada H (2017) Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Rep* 5
- [208] Lesniewski LA, Miller TA, Armstrong RB (2003) Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve* 28:493–500
- [209] Bottinelli R, Schiaffino S, Reggiani C (1991) Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol* 437:655–672
- [210] Hong E-G, Jung DY, Ko HJ, Zhang Z, Ma Z, Jun JY, Kim JH, Sumner AD, Vary TC, Gardner TW, Bronson SK, Kim JK (2007) Nonobese, insulin-deficient Ins2Akita mice develop type 2 diabetes phenotypes including insulin resistance and cardiac remodeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1687–96
- [211] Choi SJ, Files DC, Zhang T, Wang Z-M, Messi ML, Gregory H, Stone J, Lyles MF, Dhar S, Marsh AP, Nicklas BJ, Delbono O (2016) Intramyocellular Lipid and Impaired Myofiber Contraction in Normal Weight and Obese Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71:557–564
- [212] Murphy DJ (2012) The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249:541–585
- [213] Cazorla O, Wu Y, Irving TC, Granzier H (2001) Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res* 88:1028–1035
- [214] Hopf A-E, Andresen C, Kötter S, Isiç M, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röhl W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, Keulenaer GW de et al. (2018) Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res* 123:342–355
- [215] Ceulemans H, Bollen M (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84:1–39

- [216] Li Q, Zhao Q, Zhang J, Zhou L, Zhang W, Chua B, Chen Y, Xu L, Li P (2019) The Protein Phosphatase 1 Complex Is a Direct Target of AKT that Links Insulin Signaling to Hepatic Glycogen Deposition. *Cell Rep* 28:3406–3422.e7
- [217] Solaro RJ (2008) Multiplex kinase signaling modifies cardiac function at the level of sarcomeric proteins. *J Biol Chem* 283:26829–26833
- [218] Yamamoto H, Eshima H, Kakehi S, Kawamori R, Watada H, Tamura Y (2022) Impaired fatigue resistance, sarcoplasmic reticulum function, and mitochondrial activity in soleus muscle of db/db mice. *Physiol Rep* 10:e15478
- [219] Freundt JK, Linke WA (2019) Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *Journal of Applied Physiology* 126:1474–1482
- [220] Kötter S, Krüger M (2022) Protein Quality Control at the Sarcomere: Titin Protection and Turnover and Implications for Disease Development. *Front Physiol* 13:914296
- [221] Neagoe C, Opitz CA, Makarenko I, Linke WA (2003) Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil* 24:175–189
- [222] Helmes M, Trombitás K, Granzier H (1996) Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79:619–626
- [223] Unger A, Beckendorf L, Böhme P, Kley R, Frieling-Salewsky M von, Lochmüller H, Schröder R, Fürst DO, Vorgerd M, Linke WA (2017) Translocation of molecular chaperones to the titin springs is common in skeletal myopathy patients and affects sarcomere function. *Acta Neuropathol Commun* 5:72
- [224] London E, Stratakis CA (2022) The regulation of PKA signaling in obesity and in the maintenance of metabolic health. *Pharmacol Ther* 237:108113
- [225] Punkt K, Psinia I, Welt K, Barth W, Asmussen G (1999) Effects on skeletal muscle fibres of diabetes and Ginkgo biloba extract treatment. *Acta Histochem* 101:53–69
- [226] Mårin P, Andersson B, Krotkiewski M, Björntorp P (1994) Muscle fiber composition and capillary density in women and men with NIDDM. *Diabetes Care* 17:382–386
- [227] Stuart CA, Howell MEA, Yin D (2007) Overexpression of GLUT5 in diabetic muscle is reversed by pioglitazone. *Diabetes Care* 30:925–931
- [228] Holmäng A, Brzezinska Z, Björntorp P (1993) Effects of hyperinsulinemia on muscle fiber composition and capitalization in rats. *Diabetes* 42:1073–1081
- [229] Gollnick PD, Sjödin B, Karlsson J, Jansson E, Saltin B (1974) Human soleus muscle: a comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. *Pflugers Arch* 348:247–255
- [230] Dutta S, Sengupta P (2016) Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* 152:244–248
- [231] Tallis J, Hill C, James RS, Cox VM, Seebacher F (2017) The effect of obesity on the contractile performance of isolated mouse soleus, EDL, and diaphragm muscles. *Journal of Applied Physiology* 122:170–181
- [232] Staron RS, Pette D (1987) Nonuniform myosin expression along single fibers of chronically stimulated and contralateral rabbit tibialis anterior muscles. *Pflugers Arch* 409:67–73

6. Anhang

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Histologische Anatomie des Skelettmuskels	2
Abb. 2 Skelettmuskulatur unter dem Lichtmikroskop	3
Abb. 3 Tubulussystem des sarkoplasmatischen Retikulums	5
Abb. 4 Aktin- und Myosinfilamente und ihre Anordnung	6
Abb. 5 Titin des Skelettmuskels,	8
Abb. 6 Querbrückenzyklus	12
Abb. 7 Calcium Freisetzung und tetanische Muskelkontraktion	16
Abb. 8 Schematische Darstellung von Lipid Droplets, Perilipinen und der Regulation der Lipidoxidation	19
Abb. 9 vorbereiteter Präparationsplatz	41
Abb. 10 präparierter und eingespannter Musculus soleus	42
Abb. 11 Aufbau des Myographen im Labor	44
Abb. 12 Beispielhafte Einzelzuckung eines entnommenen M. soleus beim Einstellen der optimalen Muskellänge,	45
Abb. 13 beispielhaft tetanische Reizung eines isolierten M. soleus bei der Bestimmung der optimalen Stimulationsfrequenz	46
Abb. 14 Darstellung der tetanischen Ermüdungsmessung	48
Abb. 15 Darstellung der Ermüdungsmessung am Beispiel eines M. soleus aus einem Tier der Kontrollgruppe,	48
Abb. 16 Darstellung der statistischen Signifikanz der Gewichtsunterschiede in der gesamten Stichprobe zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Gruppe,	60
Abb. 17 Darstellung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Blutzuckerwerte in der gesamten Stichprobe zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Gruppe,	61
Abb. 18 Darstellung der statistischen Signifikanz der Gewichtsunterschiede in der gemessenen Subpopulation zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Mäusen	62
Abb. 19 Darstellung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Blutzuckerwerte in der gemessenen Subpopulation zwischen Kontroll-, DIOSTZ- und STZ- Mäusen	63
Abb. 20 Auswertung der Unterschiede in der optimalen Muskellänge der präparierten M. solei	64
Abb. 21 Analyse der Gewichtsunterschiede der Muskeleinzeltgewichte	65
Abb. 22 Analyse des Verhältnisses von Muskeleinzeltgewicht zu Körpergewicht zwischen den Versuchsgruppen	67
Abb. 23 Darstellung der Kraftmessung (PO und sPO) der Versuchsgruppen im direkten Vergleich	69
Abb. 24 prozentuale Darstellung der PO und sPO im Vergleich der drei Behandlungsgruppen	72
Abb. 25 Darstellung der prozentualen Ermüdungsmessung (Fatigue) im Vergleich der Behandlungsgruppen	74
Abb. 26 Darstellung der prozentualen Ergebnisse der Ermüdungsmessung über 9 Minuten	75
Abb. 27 Darstellung der absoluten Kraftwerte der Ermüdungsmessung	76
Abb. 28 Darstellung der Ermüdungsmessung am Beispiel eines diabetischen Versuchstieres über 30 Minuten; auf der y-Achse ist die Kraftantwort in mV dargestellt, auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten aufgetragen, dargestellt ist die erfasste Kraftantwort eines diabetischen Versuchstieres über 30 Minuten	76
Abb. 29 Darstellung der Muskelfasertypen Färbung,	77
Abb. 30 Darstellung der statistischen Auswertung der prozentualen Muskelfasertypen Verteilung im Vergleich der drei Versuchstiergruppen;	79

Abb. 31 Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Perilipin Färbung am Beispiel von Perilipin 2;.....	80
Abb. 32 Darstellung der immunhistochemisch gefärbten Perilipin2 Anzahl sowie des prozentualen Anteils pro <i>Region of interest</i> (ROI).....	81
Abb. 33 Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Perilipin Färbung am Beispiel von Perilipin 5	82
Abb. 34 Darstellung der immunhistochemisch gefärbten Perilipin 5 Anzahl sowie des prozentualen Anteils pro <i>Region of interest</i> (ROI).....	83
Abb. 35 relative Perilipin 2 und 5 Expression im Vergleich mit Aktinin	85
Abb. 36 Relative Titin S11878 und relative PKCT497 Phosphorylierung.....	86
Abb. 37 Titin Isoformen- Verhältnis T2 Bande zu N2A.....	88
Tabelle 1 Eigenschaften der Muskelfasertypen.....	14
Tabelle 2 Chemikalien und Reagenzien	33
Tabelle 3 Puffer und Lösungen	34
Tabelle 4: verwendete primäre Antikörper	36
Tabelle 5 verwendete Sekundärantikörper	37
Tabelle 6: verwendete Titin Antikörper.....	37
Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Laborgeräte.....	38
Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Software	39
Tabelle 9 Zusammensetzung Standard Polyacrylamid Gel	53
Tabelle 10 Zusammensetzung Titin Polyacrylamid Gel.....	54
Tabelle 11 prozentuale Mittelwerte der Ermüdungsmessung.....	73
Tabelle 12 prozentuale Mittelwerte der Muskelfasertypenbestimmung.....	78
Tabelle 13 Auswertung der immunhistochemischen Perilipin 2 Färbung;.....	80
Tabelle 14 Auswertung der immunhistochemischen Perilipin 5 Färbung.....	82
Formel 1: Berechnung der optimalen Faserlänge.....	49
Formel 2 Berechnung <i>Cross Sectional Area</i>	49
Formel 3 Berechnung spezifische Muskelkraft.....	49

Danksagung

Diese Dissertation wäre ohne die Unterstützung vieler besonderer Menschen nicht möglich gewesen. Hiermit geht ein langer, lehrreicher und spannender Weg zu Ende, weshalb ich DANKE sagen möchte.

Ein ganz besonderer Dank gebührt dabei meiner Doktormutter Prof. Dr. Martina Krüger für die Chance der Promotion in Ihrem Institut. Während der gesamten Arbeit stand sie immer mit Rat und Tat zur Seite. Weiter möchte ich mich für die fachliche Begleitung, das Vertrauen in meine Arbeit und die wertvollen Impulse bedanken. Ihre Unterstützung und konstruktive Kritik haben mich stets motiviert und weitergebracht.

Nicht zuletzt danke ich auch allen Kolleginnen und Kollegen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und die gemeinsame Zeit im Labor so angenehm gemacht haben. Insbesondere möchte ich PD Dr. Sebastian Kötter für die fortwährende Unterstützung, insbesondere bei der Erstellung der Western Blots danken. Auch Sabine Bongardt gebührt ein großer Dank für die große Unterstützung bei allen Methoden im Labor sowie für die Erstellung weiterer immunhistochemischer und biochemischer Auswertungen. Auch Prof. Dr. Dr. Andre Heinen, Dr. André Spychala sowie Prof. Dr. Gödecke gebührt ein großer Dank, ohne euch wäre das Projekt so nicht möglich gewesen. Ebenso möchte ich mich bei Anne Hemmers und Daniela Müller für die große Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen Analyse bedanken. Danke sagen möchte ich auch meinen Mitdoktoranden Patricia, Sophia und Kathi. Der Austausch mit euch war immer sehr hilfreich und hat auch einen Spaßfaktor ins Labor gebracht.

Meiner Ehefrau Nicole und meiner kleinen Tochter Carla gebührt ebenso ein großer Dank. Ihr habt mich auf diesem Weg immer unterstützt, mich aufgebaut, wenn es einmal schwierig war und mir gezeigt, dass es auch ein Leben neben der Doktorarbeit gibt. Ohne euch, wäre das nicht möglich gewesen.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, die mir mit Geduld und ihrem unerschütterlichen Glauben an mich immer den Rücken gestärkt haben. Ihr habt mich ermutigt, meinen eigenen Weg zu gehen und nie aufzugeben – dafür danke ich euch von Herzen.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Freunde, die mich in stressigen Zeiten mit Humor, Verständnis und Ablenkung versorgt haben. Ihr habt mir gezeigt, dass es neben der Wissenschaft noch viele andere wichtige Dinge im Leben gibt.

Diese Arbeit ist das Ergebnis vieler gemeinsamer Momente, Gespräche und Erfahrungen – ich bin dankbar, diesen Weg mit euch gegangen zu sein.