

Fakultät für Medizin

Die Bedeutung des Insulinsignalwegs für eine auf der Intensivstation erworbenen Muskelschwäche (ICUAW)

Chunquan Thomas Gan

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Wolfgang Weber

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Heidrun Lewald
2. Priv.-Doz. Dr. Tobias Lahmer

Die Dissertation wurde am 22.03.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1. Intensive Care Unit Acquired Weakness	5
1.2. Der Insulinsignalweg im Muskelgewebe.....	8
1.3. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material und Methodik	13
2.1. Versuchstiere und Tiermodell.....	13
2.2. Proteinaufbereitung und Western Blot.....	16
2.3. Statistische Auswertung.....	19
3. Ergebnisse.....	20
3.1. Mortalitätsrate des Tiermodells	20
3.2. Methämoglobin	20
3.3. Körpergewicht	20
3.4. Muskelgewicht.....	22
3.5. Western Blot Analysen	24
3.5.1. Akt.....	24
3.5.2. Aktiviertes Akt (pAkt)	25
3.5.3. Aktivierte Glykogensynthasekinase 3 Beta (GSK3).....	26
3.5.4. Deaktivierte Glykogensynthasekinase 3 Beta (pGSK3)	27
3.5.5. Aktivierte Glykogensynthase (GS)	28
3.5.6. Deaktivierte Glykogensynthase (pGS).....	29
3.5.7. Zusammenfassende Betrachtung des Insulinsignalwegs.....	31
4. Diskussion	33
4.1. Qualität des Double-hit Tiermodells.....	33
4.2. Skelettmuskelatrophie durch Immobilisation und Inflammation	34
4.3. Die Beeinträchtigung des Insulinsignalwegs durch Immobilisation und Inflammation.....	35
5. Zusammenfassung	39
6. Referenzen	40
7. Danksagung	46
8. Anhang	47

Abkürzungsverzeichnis

95% KI	= 95 % - Konfidenzintervall
Akt	= Akt/Proteinkinase B (deaktiviert)
AMPK	= 5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	= einfaktorielle Varianzanalyse
BSA	= Bovines Serum-Albumin
GLUT4	= Glukosetransporter Typ 4
GS	= Glykogensynthase (aktiviert)
GSK3	= Glykogensynthasekinase 3 Beta (aktiviert)
ICUAW	= Intensive Care Unit Acquired Weakness
mRNA	= Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	= Natriumchlorid
pAkt	= phosphoryliertes Akt (aktiviert)
pGS	= phosphorylierte Glykogensynthase (deaktiviert)
pGSK3	= phosphorylierte Glykogensynthasekinase 3 Beta (deaktiviert)
SDS-PAGE	= Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sham-	= Schein-
Tris	= Tris-Aminomethan

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologische Mechanismen der ICUAW	7
Abbildung 2: Der Akt-GSK3-GS Signalweg im Skelettmuskel	11
Abbildung 3: Double-hit Tiermodell mit Immobilisation und Inflammation	15
Abbildung 4: Auftragungsschema der Proben für Western Blots	18
Abbildung 5: Methämoglobin im Blut der Versuchstiere an den Tagen 0, 4, 8 und 12.....	21
Abbildung 6: Körpergewicht der Versuchstiere an den Tagen 0, 4, 8 und 12	21
Abbildung 7: Akt Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe.....	24
Abbildung 8: pAkt Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe.....	25
Abbildung 9: GSK3 Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe.....	26
Abbildung 10: pGSK3 Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe.....	27
Abbildung 11: GS Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe.....	28
Abbildung 12: pGS Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe.....	29
Abbildung 13: Der Akt-GSK3-GS Signalweg und dessen Beeinträchtigung unter Immobilisation und Inflammation	32
Tabelle 1: Primäre und sekundärer Antikörper für Western Blot.....	18
Tabelle 2: Muskelgewicht der kontralateralen und operierten Beine nach Gruppen	23
Tabelle 3: Proteinexpression im Insulinsignalweg des Muskels unter Immobilisation, Inflammation und Insulinstimulation	30

1. Einleitung

1.1. Intensive Care Unit Acquired Weakness

Die Mortalitätsrate von kritisch kranken Patienten konnte durch stetigen Fortschritt in der Intensivmedizin erheblich gesenkt werden. Jedoch erleidet noch immer eine beachtliche Anzahl dieser Patienten während des Aufenthaltes auf Intensivstation eine generalisierte Muskelschwäche, welche in der Fachliteratur als ICUAW (englisch: Intensive Care Unit Acquired Weakness) bezeichnet wird. Diese betrifft 26 – 67 % aller mechanisch ventilierten Patienten und geht einher mit einer Verlängerung der Intensivbehandlung und Hospitalisationszeit unter erhöhter Morbidität und Mortalität. Zusätzlich ist diese mit anhaltenden körperlichen Einschränkungen assoziiert (Hermans und van den Berghe 2015). Dies resultiert zum einen in einer langfristigen Minderung der Lebensqualität und zum anderen in einer Erhöhung Krankheits-assoziiertes-Kosten kritisch kranker Patienten. Daher ist die Prävention und Behandlung der ICUAW von hoher klinischer sowie gesundheitsökonomischer Relevanz.

Die der ICUAW zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozesse sind komplex und nicht abschließend geklärt. Bekannt sind pathologische Veränderungen in der Innervation des Muskels (englisch: Critical Illness Polyneuropathy) und im Muskel selbst (englisch: Critical Illness Myopathy), welche schließlich zu einer axonalen Degeneration, Muskelatrophie und Muskelschwäche führen (**Abbildung 1**). Hierbei kann die Myopathie sowohl getrennt als auch kombiniert mit der Polyneuropathie auftreten und betrifft vorwiegend die Muskulatur proximaler Extremitäten und des Atemsystems (Latronico und Bolton 2011). Als Ursache der Myopathie wird eine Proteinstoffwechselstörung des Muskels diskutiert, mit einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten kataboler Prozesse (Scheffold et al. 2010). Schließlich führt dies zu einem Energiedefizit im Muskel mit Schwäche und Atrophie.

Wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung einer ICUAW sind Immobilisation (Chambers et al. 2009), systemische Inflammation (Iwashyna et al. 2010), Hyperglykämie (van den Berghe et al. 2001), Multiorganversagen und lange Dauer der mechanischen Ventilation (Jonghe et al. 2002). Darüber hinaus wird der pharmakotherapeutische Einsatz von Muskelrelaxantien und Glukokortikoiden als Risikofaktor diskutiert (Jonghe et al. 2002; Macfarlane und Rosenthal 1977; Friedrich et al. 2015). Allerdings sind diesbezüglich auch protektive Effekte beschrieben worden (Hermans et al. 2007; Papazian et al. 2010).

Die Diagnose der ICUAW wird häufig klinisch gestellt und bezeichnet eine Muskelschwäche ohne bekannte andere Ursache außer kritischer Krankheit. Um den

Schweregrad der Muskelschwäche in unterschiedlichen Muskelgruppen einzuschätzen, stellt die Biopsie von Muskelgewebe den Goldstandard dar. Darüber hinaus kann an wachen und kooperierenden Patienten die Medical Research Council (MRC)-Summen-Skala verwendet werden; an bewusstlosen Patienten können elektrophysiologische Testungen der Nervenleitgeschwindigkeit und Muskelkontraktion erfolgen (Kress und Hall 2014). Doch aufgrund der Invasivität einer Muskelbiopsie wird diese initial oft nicht durchgeführt. Daher bleibt es schwierig die Diagnose einer ICUAW zuverlässig zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung stellen zu können.

Die Therapie der ICUAW ist, bedingt durch mangelndes Verständnis über Pathophysiologie und Diagnostik, nur eingeschränkt möglich. Ein wichtiger Punkt zur Prävention ist das Meiden der Risikofaktoren. Darunter fallen eine aggressive Therapie der Sepsis, strenge Regulierung des Blutzuckerspiegels und eine möglichst kurze Dauer der mechanischen Beatmung (Kress und Hall 2014; Hermans und van den Berghe 2015). Eine initiale, kurzzeitige Immobilisation des Patienten lässt sich nicht verhindern, daher stellen hierbei Maßnahmen zur Frühmobilisierung des Patienten eine wichtige Rolle dar (Schaller et al. 2016; Schweickert et al. 2009). Dennoch existiert zurzeit noch kein einheitlicher Konsens für die Prävention oder Therapie der ICUAW.

Die ICUAW besitzt eine hohe Relevanz für kritisch kranke Patienten, jedoch sind Behandlungsmöglichkeiten dieses Krankheitsbildes beschränkt. Um bessere diagnostische und therapeutische Verfahren zu ermöglichen, ist es unerlässlich die zugrundeliegende Pathophysiologie dieser Muskelatrophie genauer zu erforschen. Die aktuelle Fachliteratur suggeriert als Ursache dafür eine Störung des muskeleigenen Energiestoffwechsels während kritischer Krankheit. Jedoch ist die Datenlage diesbezüglich rar, insbesondere dahingehend welche Stoffwechselwege betroffen sind und in welchem Abschnitt diese eingeschränkt sind (Crossland et al. 2019). Daher ist es notwendig pathologische Stoffwechselwege im Muskel während einer ICUAW zu identifizieren, um schließlich ein besseres Verständnis für die Entstehung dieses Krankheitsbild erlangen zu können.

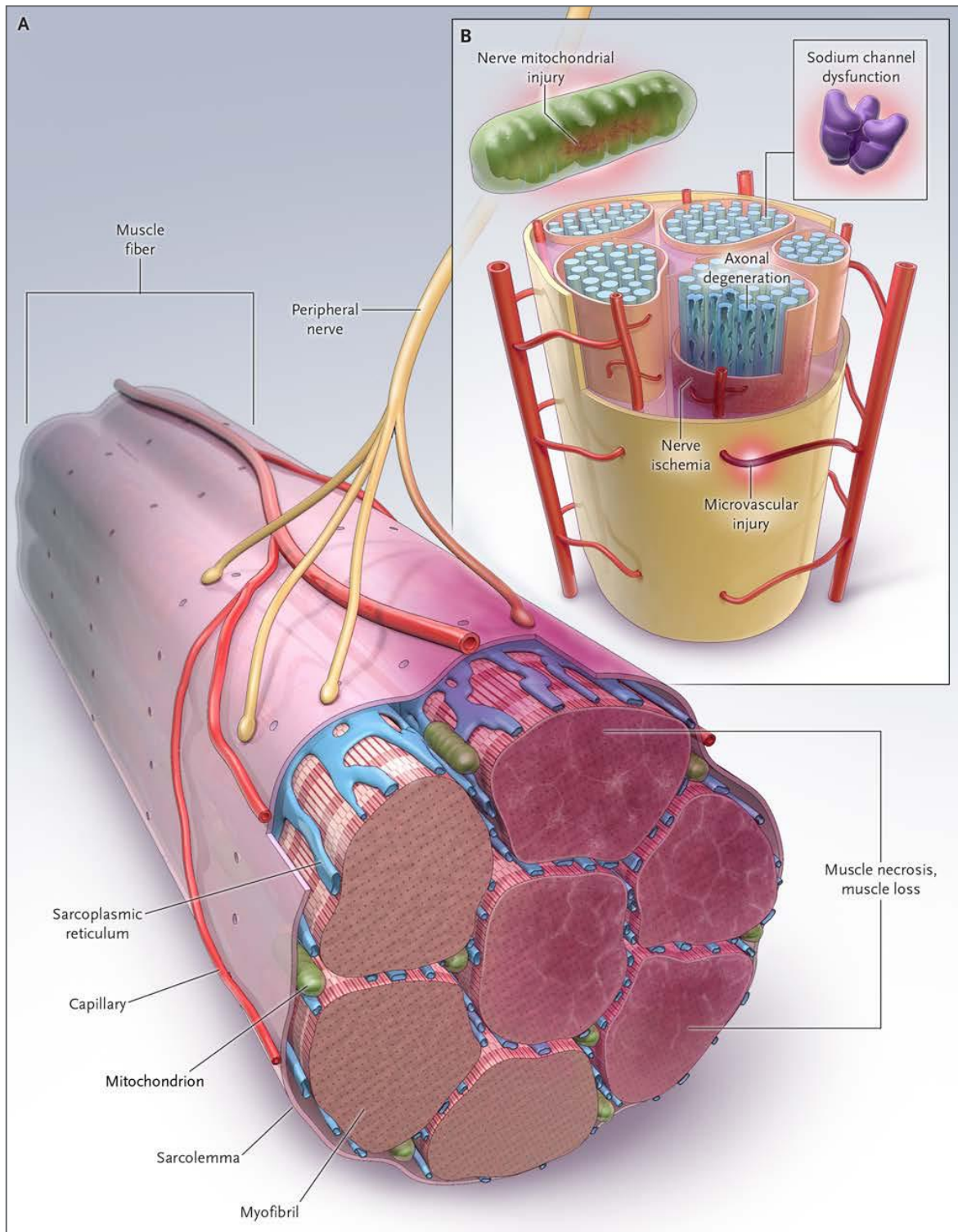


Abbildung 1: Pathophysiologische Mechanismen der ICUAW

Feld A zeigt den Skelettmuskelschwund. Zu den möglichen Mechanismen gehören mikrovaskuläre Ischämie, Katabolismus und Immobilität. Feld B zeigt die Polyneuropathie mit axonaler Degeneration. Zu den möglichen Mechanismen gehören mikrovaskuläre Schädigungen mit daraus resultierender Nervenischämie, Funktionsstörungen der Natriumkanäle und Schädigung der Nervenmitochondrien.

Reproduced with permission from (Kress, John P.; Hall, Jesse B. (2014): ICU-acquired weakness and recovery from critical illness. In: The New England journal of medicine 370 (17), S. 1626–1635., Copyright Massachusetts Medical Society.

1.2. Der Insulinsignalweg im Muskelgewebe

Das Makromolekül Insulin wird in den Beta-Zellen des Pankreas synthetisiert und bei erhöhtem Blutzuckerspiegel, im Regelfall postprandial, sekretiert. Der erhöhte Insulinspiegel bewirkt eine Reduzierung der Glukose im Blut durch deren Aufnahme in die Körperzellen, unter anderem ins Skelettmuskelgewebe. Hierbei bindet Insulin an den Insulinrezeptor der Skelettmuskelzellen und initiiert dadurch den vermehrten Einbau von Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) in die Zellmembran (Huang und Czech 2007). Zudem führt die Insulinbindung zur Aktivierung anaboler Stoffwechselwege, während katabole Stoffwechselwege inhibiert werden, um Glykogen- und Proteinbiosynthese zu ermöglichen (Stitt et al. 2004). Hierbei nimmt die Signalkaskade über Akt, Glykogensynthasekinase 3 Beta (GSK3) und Glykogensynthase (GS) eine zentrale Rolle ein (**Abbildung 2**). Die Aktivierung dieses Signalwegs ist essenziell für die Homöostase des Blutzuckerspiegels und eine adäquate Energieversorgung des Skelettmuskels.

Akt, auch bekannt als Proteinkinase B, steht am Anfang der Insulinsignalkaskade. Je nach Phosphorylierung befindet sich dieses Enzym in seiner aktivierten oder deaktivierten Form. In der Abwesenheit von Insulin liegt Akt in seiner dephosphorylierten, deaktivierten Form vor. Bei Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor wird Akt durch Phosphoinositid-3-abhängige Kinase-1 zu phosphoryliertem Akt (pAkt) umgewandelt und somit aktiviert (Alessi et al. 1997). Anschließend bewirkt aktiviertes Akt (pAkt) im Rahmen des Insulinsignalwegs eine Phosphorylierung der GSK3 (Leto und Saltiel 2012). Neben dem Glukosestoffwechsel reguliert Akt diverse andere zelluläre Funktionen, einschließlich Überleben, Wachstum, Proliferation und Proteinsynthese (Manning und Toker 2017).

GSK3 besitzt ebenfalls eine wichtige Rolle innerhalb der Insulinsignalkaskade und ist je nach Phosphorylierungsstatus aktiviert oder deaktiviert. In Abwesenheit von Insulin liegt GSK3 in ihrer dephosphorylierten, aktivierten Form vor. Bei Bindung von Insulin wird GSK3 durch aktiviertes Akt (pAkt) in phosphorylierte GSK3 (pGSK3) umgewandelt und somit deaktiviert. Im Unterschied zu vielen anderen Proteinkinasen, welche durch Signaltransduktion in deren aktivierte Form übergeführt werden, besitzt GSK3 die Eigenschaft konstitutiv aktiviert zu sein und durch Phosphorylierung deaktiviert zu werden. Aktivierte GSK3 bewirkt im Rahmen des Insulinsignalwegs eine Phosphorylierung der Glykogensynthase (McManus et al. 2005). Daneben ist GSK3 ein wichtiger Mediator des Wnt Signalwegs, welcher Muskelwachstum und -reparatur reguliert (Maltzahn et al. 2012). GSK3 ist somit in diversen Signalwegen des zellulären Stoffwechsels beteiligt.

Glykogensynthase stellt das Schlüsselenzym der Glykogensynthese dar und katalysiert die

Bindung von Uridindiphosphat-Glukose an bereits bestehende Glykogenketten. Sie bewirkt die Speicherung von Glukose im Skelettmuskel und ist daher essenziell für dessen Energiestoffwechsel. Die Synthese von Glykogen repräsentiert einen Endpunkt in der Insulinsignalkaskade.

Die Regulation der Glykogensynthese findet ebenfalls durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung statt. In Abwesenheit von Insulin wird Glykogensynthese aufgrund der konstitutiven Aktivität von GSK3 in phosphorylierte Glykogensynthese (pGS) umgewandelt und somit deaktiviert. Die Bindung von Insulin und darauffolgende Deaktivierung von GSK3 zu pGSK3 führt zur Dephosphorylierung und Aktivierung der Glykogensynthese durch Proteinphosphatase 1. Die Synthese von Glykogen wird folglich durch eine insulinabhängige Enthemmung der Glykogensynthese ermöglicht. Daneben wird die Aktivität der Glykogensynthese von weiteren Enzymen reguliert: Inhibitoren sind 5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK), Proteinkinase A und Caseinkinase 2. Ein weiterer Aktivator ist Glukose-6-Phosphat (Bouskila et al. 2010).

Der Akt-GSK3-GS Signalweg gehört zu den besterforschten intrazellulären Signalwegen der Grundlagenforschung. Dieser ist in fast allen Zellen des Körpers vorzuweisen, wobei etliche Interaktionen mit anderen intrazellulären Signalwegen existieren. In diesem Zusammenhang ist vor allem das Zusammenspiel mit dem RAS-ERK- und AMPK Signalweg hervorzuheben. Beide interagieren auf unterschiedlichen Abschnitten mit dem Akt-GSK3-GS Signalweg, um zelluläres Überleben zu sichern. Hierbei reguliert der RAS-ERK Signalweg Zellwachstum und -proliferation, während der AMPK Signalweg zellulären Energiestoffwechsel an katabole und anabole Reize anpasst (Moelling et al. 2002; Zimmermann und Moelling 1999; Manning und Toker 2017).

Beeinträchtigungen des Akt-GSK3-GS Signalwegs können aufgrund dessen ubiquitären Existenz im Organismus zu vielfältigen Krankheitsbildern führen. Insbesondere im Muskelgewebe konnte gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung dieses Signalwegs mit Insulinresistenz, Glukoseintoleranz, Typ 2 Diabetes und Muskelatrophie einhergehen (Cho et al. 2001; Garofalo et al. 2003; Glass 2010). Auch ist bei kritisch Kranken, welche im Rahmen einer ICUAW an Muskelschwund leiden, eine Hyperglykämie mit verminderter Insulinsensibilität bekannt. Hierbei konnte eine beeinträchtigte GLUT4 Translokation nachgewiesen werden (Weber-Carstens et al. 2013).

Im Rahmen der ICUAW wurde der Akt-GSK3-GS Signalweg bisher lediglich auf die Akt Aktivierung, dem ersten Schritt der Signalkaskade, untersucht. Doch hierbei zeigten Studien unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits wurde im Verbrennungsmodell der Maus eine

beeinträchtigte Akt Aktivierung nachgewiesen (Sugita et al. 2005), andererseits konnte in Patienten mit ICUAW eine erhaltene Akt Aktivierung gezeigt werden (Weber-Carstens et al. 2013). Daher ist der Zusammenhang zwischen einer ICUAW und dem Akt-GSK3-GS Signalweg zurzeit umstritten und erfordert weitere Abklärung. Neue Erkenntnisse zur Bedeutung des Insulinsignalwegs für die ICUAW ermöglichen ein tieferes Verständnis über dieses komplexe Krankheitsbild und können zu verbesserten Behandlungsmethoden beitragen.

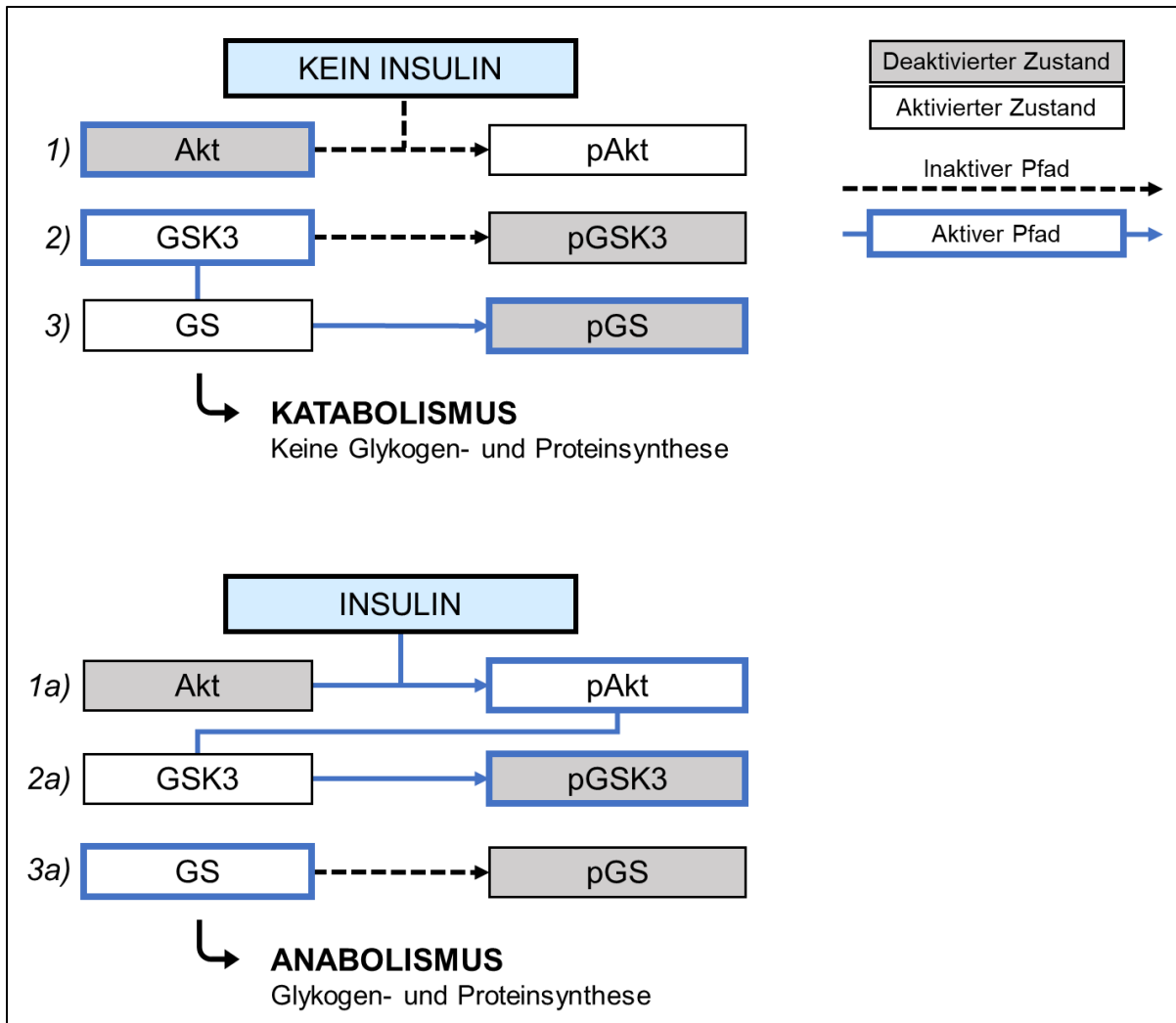


Abbildung 2: Der Akt-GSK3-GS Signalweg im Skelettmuskel

Kein Insulin:

1) **Akt** ist im deaktivierten Zustand.

2) Durch die fehlende Hemmung von Akt verbleibt Glykogensynthase-Kinase 3 (**GSK3**) im aktivierten Zustand und führt ihre konstitutive Enzymaktivität weiterhin aus.

3) Dies führt zu einer Deaktivierung von Glykogensynthase (**GS**) zu Phospho-Glykogensynthase (**pGS**).

Infolgedessen kann keine Glykogensynthese erfolgen. Die fehlende Aktivierung von Akt führt außerdem zur katabolen Stoffwechsellage mit Hemmung der Proteinsynthese.

Insulin:

1a) Insulin bewirkt eine Aktivierung von Akt zu phosphoryliertem Akt (**pAkt**).

2a) Dies führt zur Deaktivierung von GSK3 zu Phospho-Glykogensynthase-Kinase 3 (**pGSK3**).

3a) Infolgedessen verbleibt **GS** im aktivierten Zustand und kann Glykogen synthetisieren.

Die Aktivierung von Akt zu pAkt führt zudem zur anabolen Stoffwechsellage mit einer Aktivierung der Proteinsynthese.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Zwei wichtige Risikofaktoren für das Entstehen einer ICUAW sind Immobilisation und systemische Inflammation. Zusätzlich entwickeln kritisch kranke Patienten oft eine Hyperglykämie auf Grund einer Insulinresistenz. Dies könnte eine Rolle bei der Entwicklung der Muskelatrophie im Rahmen der ICUAW spielen. Daher ist es wichtig die Pathophysiologie hinter diesem Phänomen zu beleuchten, um ein besseres Verständnis über die Entstehung der ICUAW gewinnen zu können.

Deshalb soll mithilfe der hier vorliegenden Studie dargelegt werden, auf welche Weise Immobilisation und systemische Inflammation die Insulinwirkung im Skelettmuskel beeinflussen. Hierfür werden die Auswirkungen beider Faktoren auf die Signaltransduktion des Insulinsignalweg untersucht. Dies erfolgt durch die Simulation einer ICUAW im Tiermodell mit anschließender Analyse der Auswirkungen auf die Enzyme des Insulinsignalwegs, i. e. Aktivierung von Akt und Phosphorylierung seiner nachgeschalteten Enzyme GSK3 und GS.

2. Material und Methodik

2.1. Versuchstiere und Tiermodell

Nach Genehmigung des Versuchs durch die Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantragsnummer: 55.2-1-54-2532-121-2015) wurden insgesamt 134 männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Deutschland) für mindestens sieben Tage an die Standardbedingungen der Tierhalteeinrichtung im Labor akklimatisiert. Der Tierhalteraum unterlag einer personenlimitierten Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildetes Personal, Klimatisierung und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden. Die Haltung der Tiere erfolgte in einer pathogenfreien Umgebung in Makrolonkäfigen Typ III und IV. Futter (Rattenpellets, Altromin) und Trinkwasser waren für die Tiere frei zugänglich, Trinkflaschen wurden zwei bis dreimal die Woche gewechselt. Den Tieren standen zudem Holzgranula und Kriechröhrchen aus Pappe und Zellstoff als Nestbaumaterial zur Verfügung. Zu Versuchsbeginn lag das Gewicht der Ratten bei circa 200-250 g. Täglich wurde das Körpergewicht der Tiere erfasst und deren klinischer Zustand bewertet.

Um die Auswirkung einer ICUAW auf den Insulinsignalweg zu simulieren, wurde ein 13-tägiges (Tag 0 bis Tag 12) Double-hit Modell mit den Faktoren Immobilisation und Inflammation verwendet (**Abbildung 3**). Es handelt sich dabei um ein etabliertes Modell in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Heidrun Lewald (Fink et al. 2008). Hierfür wurden die Tiere randomisiert in vier Versuchsgruppen unterteilt: Kontrolle, Immobilisation, Inflammation und Kombination von Immobilisation und Inflammation. An Tag 12 des Experiments erfolgte eine weitere Unterteilung der Tiere in die Gruppen Insulin- oder Kochsalzinjektion. Falls ein Tier während des Versuchs verstarb, wurde ein weiteres Tier entsprechend der Gruppe hinzugefügt.

Sämtliche Eingriffe an lebenden Tieren wurden gemäß Tierversuchsantrag von Herr Prof. Stefan Schaller durchgeführt. Tiere der Immobilisationsgruppen wurden an Tag 0 mittels Isofluran in Vollnarkose versetzt und danach mit einer gekürzten 14 Gauge Vasofix Safety Venenverweilkanüle (B. Braun Melsungen, Deutschland) intubiert und beatmet. Zur Analgesie wurde 0,02 mg/kg Buprenorphin injiziert, die anschließende Überwachung beinhaltete das Monitoring von Blutdruck und Blutgas und der Beatmung mittels kontinuierlicher Messung des endexpiratorischen Kohlenstoffdioxids. Die Immobilisation erfolgte an einem Hinterbein durch Fixierung des Knie- und Sprunggelenks im 90 Grad Winkel mittels Kirschner Drähten von 1,0 mm Durchmesser. Der Draht wurde für den gesamten darauffolgenden Zeitraum von 12 Tagen belassen. Tiere der Gruppen Sham-

Immobilisation erhielten dieselbe Prozedur, jedoch wurde der Kirschner Draht sofort wieder entfernt. Das kontralaterale Hinterbein erhielt keine Behandlung und diente im Verlauf als Kontrolle.

Tiere der Gruppe Inflammation erhielten 56 mg/kg hitzeinaktiviertes *Corynebacterium parvum* (Roche Diagnostics, Penzberg) intravenös über die Vena dorsalis penis injiziert. Die Injektion von *Corynebacterium parvum* induziert eine granulomatöse Inflammation der Leber (Farquhar et al. 1983; Veihelmann et al. 1997), mit Höhepunkt ungefähr am fünften Tag (Fink et al. 2003). Um die systemische Inflammation über den gesamten Versuchsverlauf aufrechtzuerhalten, erfolgten repetitive Injektionen an den Tagen 0, 4 und 8. Die Injektion an Tag 0 erfolgte im Rahmen der Immobilisation beziehungsweise Sham-Immobilisation unter Vollnarkose, Intubation, Beatmung, Analgesie und Überwachung der Vitalparameter. An Tagen 4 und 8 wurde hierfür eine Kurznarkose mittels Isofluran über eine Plexiglaskammer induziert und für Blutentnahme und *Corynebacterium parvum* Injektion über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Die Blutentnahme und Injektion über die Vena dorsalis penis erfolgten mittels Venenverweilkatheter der Größe 26 Gauge (B. Braun Melsungen, Deutschland). Das Blut wurde mittels heparinisierter Kapillare entnommen. Anschließend wurde *Corynebacterium parvum* in oben genannter Dosierung injiziert. Die Überwachung der systemischen Inflammationsreaktion erfolgte über tägliche Körpergewichtsmessungen und Messung des venösen Methämoglobinanteils an Tagen 0, 4, 8 und 12. Sham-Inflammationsgruppen erhielten 0,5 ml einer 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl) injiziert. Ansonsten war die Prozedur identisch.

An Tag 12 wurden die Versuchstiere nach mindestens sechs Stunden Fasten, bei uneingeschränktem Zugriff zu Wasser, unter Intubation in Vollnarkose versetzt (Verfahren identisch zur Immobilisation, siehe oben). Das Fasten vor der Insulinstimulation ermöglicht es Nüchternblutzuckerwerte zu ermitteln. Anschließend wurde in tiefer Isoflurannarkose die Bauchhöhle eröffnet und die Portalvene zügig freigelegt. Insulingruppen erhielten 0,65 IU/kg Insulin intravenös über die Vena portae injiziert. Fünf Minuten später wurden beide Musculi tibiales, Musculi soleii und Musculi gastrocnemii entnommen, gewogen, mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und bei -80 °C gelagert. Weiterhin in tiefer Vollnarkose erfolgten Ausbluten und damit Euthanasie der Tiere. Sham-Insulingruppen erhielten ein äquivalentes Volumen an 0,9 % NaCl Lösung anstatt Insulin injiziert. Ansonsten war die Prozedur identisch.

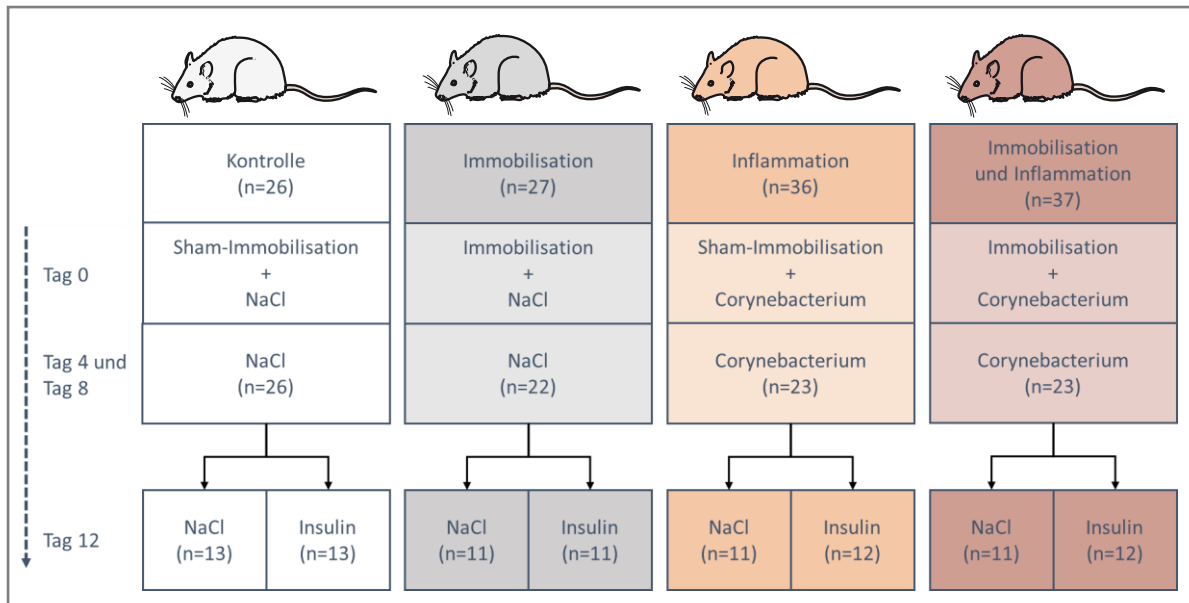


Abbildung 3: Double-hit Tiermodell mit Immobilisation und Inflammation

Dargestellt sind die am operierten Bein durchgeführten Prozeduren. Das kontralaterale Bein diente als Kontrolle. Die Versuchstiere wurden zufällig den vier Versuchsgruppen zugeteilt. Immobilisation und Inflammation wurden anschließend über einen Zeitraum von 12 Tagen aufrechterhalten. An Tag 12 erfolgte eine weitere Unterteilung der Versuchsgruppen gemäß Behandlung mit Insulin oder 0,9 % NaCl Lösung. Insgesamt waren 134 Tiere für diesen Versuch bereitgestellt worden. 8 Tiere wurden für Vorversuche benötigt. Für das Double-hit Modell wurden 126 Tiere verwendet, davon verstarben insgesamt 16 während des Versuchs (Kontrollgruppe: 0 von 26; Immobilisationsgruppe: 0 von 27; Inflammationsgruppe: 8 von 36; Kombinationsgruppe: 8 von 37). Bei weiteren 16 Tieren scheiterte die Erzeugung der Immobilisation oder systemischen Inflammation. 94 Tiere nahmen an dem Insulinversuch an Tag 12 teil. Nach der anschließenden Präparation und Aufbereitung der Muskeln verblieben 89 Tiere für die Western Blot Analysen.

2.2. Proteinaufbereitung und Western Blot

Musculi soleii und Musculi gastrocnemii wurden für etwaige immunhistochemische Untersuchungen bei -80 °C aufbewahrt. Zur Extraktion des Proteins für den Western Blot wurden Musculi tibiales in RIPA Pufferlösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) unter Zugabe von Protease-Inhibitoren lysiert und mittels TissueRuptor II™ (Qiagen, Deutschland) homogenisiert. Hierbei wurde stets auf Trockeneis gearbeitet. Der Überstand wurde in der Zentrifuge bei 4 °C für 30 Minuten mit 14000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Es folgte eine dreifache Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford mittels Bio-Rad Protein Assay Kit II (Bio-Rad Laboratories, USA). Dafür wurde extrahiertes Protein in einer Verdünnung von 1:5 und 1:10 in Aqua destillata gegen die Standardkonzentrationen des Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set (Thermo Scientific, USA) in einer 96-well pureGrade™ Mikrotiterplatte (Brand, Deutschland) aufgetragen. Die Konzentration wurde im Anschluss mithilfe des Absorptionsmessgeräts Sunrise™ (Tecan, Schweiz) und der PC-Software Magellan™ (Tecan, Schweiz) bestimmt.

Die Proben wurden zur Vorbereitung für den Western Blot mithilfe von Laemmli-Reagenz, bestehend aus Natriumdodecylsulfat (SDS), Glycerol und Bromphenolblau, einheitlich auf eine Konzentration von 2 µg/µl eingestellt und anschließend im Thermomixer comfort (Eppendorf, Deutschland) bei 95 °C für fünf Minuten unter Schütteln denaturiert. 20 µl jeder Probe wurden für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf ein TGX Stain Free™ FastCast™ Acrylamide Kit Gel (Bio-Rad Laboratories, USA) nach einheitlichem Schema aufgetragen (**Abbildung 4**). Dann wurden die Proben bei einer konstanten Spannung von 100 Volt für 20 Minuten und darauffolgenden 35 Minuten bei 200 Volt im Mini-PROTEAN™ Tetra Cell System (Bio-Rad Laboratories, USA) nach Proteinmasse aufgetrennt. Die Pufferlösung für die Elektrophorese bestand aus Aqua destillata, Tris-Aminomethan (Tris), Glycin und SDS. Anschließend erfolgte mithilfe des Imagers ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, USA) und der PC-Software ImageLab (Bio-Rad Laboratories, USA) die Fluoreszenzaktivierung und Qualitätskontrolle.

Vor Beginn des Western Blots wurden die hierfür verwendeten Amersham™ Hybond 0.2 µm PVDF Low Fluorescence Membranen (GE Healthcare Life Sciences, USA) für eine Minute in Methanol (Carl Roth, Deutschland) getränkt und anschließend in Pufferlösung aus Tris und Glycin inkubiert. Die aufgetrennten Proben wurden mittels konstanter Spannung von 100 Volt für 60 Minuten im Criterion Blotter (Bio-Rad Laboratories, USA) und Mini Trans-Blot Cell Tank Blot (Bio-Rad Laboratories, USA) auf die Membranen transferiert. Die Pufferlösung für Western Blots bestand aus Aqua destillata, Tris und Glycin. Danach

wurden mithilfe des Imagers ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, USA) Proteingehaltskonzentrationen gemessen und eine Qualitätsprüfung der Blots durchgeführt. Diese wurden im nächsten Schritt für eine Stunde in Roti-Blocklösung (Carl Roth, Deutschland) inkubiert und dann dreimal für jeweils fünf Minuten in TBS/T Lösung, bestehend aus Aqua destillata, Tris, NaCl und Tween 20 (Sigma-Aldrich, Deutschland), gewaschen (Bio-Rad Laboratories 2021). Anschließend erfolgte die Inkubation in primärer Antikörperlösung, bestehend aus primärem Antikörper (**Tabelle 1**) mit einer Verdünnung von 1:5000 in TBS/T, über mindestens 16 Stunden bei 4 °C (Cell Signaling Technology 2021). Die Western Blots wurden mittels primärer Antikörper auf Expression folgender Proteine getestet: Akt, pAkt, GSK3, pGSK3, GS und pGS.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen für dreimal fünf Minuten in TBS/T gewaschen und danach für eine Stunde in sekundärer Antikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper lag hierbei mit einer Verdünnung von 1:10000 in TBS/T gelöst vor. Nach dreimal fünfminütigem Waschen in TBS/T wurden die Membranen mittels Clarity™ Western ECL Substrat (Bio-Rad Laboratories, USA) behandelt. Anschließend erfolgte die Bandendetektion im Imager ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, USA) und deren quantitative Auswertung mithilfe der PC-Software ImageLab (Bio-Rad Laboratories, USA). Dabei wurde die Pixelintensität der Banden gemessen und als Maß für die jeweilige Proteinexpression verwendet. Um eine konstante Proteinbeladung zu gewährleisten, erfolgte hierbei eine Normalisierung auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Johnson 2012).

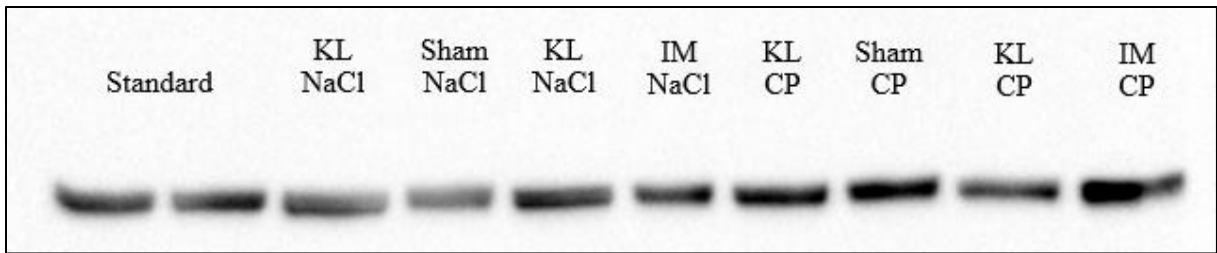


Abbildung 4: Auftragungsschema der Proben für Western Blots

Auftragungsschema der Proben für Gelelektrophorese und Western Blot. Hier anhand eines Ergebnisses von Proben aus der Insulingruppe mit Akt als primären Antikörper. Immobilisation (**IM**) beziehungsweise Sham-Immobilisation (**Sham**) erfolgte einseitig, das kontralaterale Bein (**KL**) diente zur Kontrolle. Injektionen von 0,9 % Kochsalzlösung (**NaCl**) beziehungsweise *Corynebacterium parvum* (**CP**) erfolgten systemisch. Bezeichnung der Banden (Versuchsgruppen mit Bein und jeweiliger Behandlung von links nach rechts):

0. Kontrolltiere ohne jegliche Behandlung (Standard), zweifach
1. kontralaterales Bein (KL): NaCl Injektion (NaCl)
operiertes Bein: Sham-Immobilisation (Sham) und NaCl Injektion (NaCl)
2. kontralaterales Bein (KL): NaCl Injektion (NaCl)
operiertes Bein: Immobilisation (IM) und NaCl Injektion (NaCl)
3. kontralaterales Bein (KL): *Corynebacterium parvum* Injektion (CP)
operiertes Bein: Sham-Immobilisation (Sham) und *Corynebacterium parvum* Injektion (CP)
4. kontralaterales Bein (KL): *Corynebacterium parvum* Injektion (CP)
operiertes Bein: Immobilisation (IM) und *Corynebacterium parvum* Injektion (CP)

Protein	Produktname Antikörper	Unternehmen
Akt	Akt Antibody	Cell Signaling Technology, USA
Phosphoryliertes Akt (pAkt)	Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, USA
Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3)	GSK-3β (D5C5Z) XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, USA
Phosphorylierte Glykogensynthase-Kinase 3 (pGSK3)	Phospho-GSK-3β (Ser9) (D85E12) XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, USA
Glykogensynthase (GS)	Glycogen Synthase Antibody	Cell Signaling Technology, USA
Phosphorylierte Glykogensynthase (pGS)	Phospho-Glycogen Synthase (Ser641) Antibody	Cell Signaling Technology, USA
Sekundärer Antikörper	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, USA

Tabelle 1: Primäre und sekundärer Antikörper für Western Blot

Protein, Produktname und produzierendes Unternehmen der verwendeten Antikörper. Western Blots wurden im primären Antikörper für mindestens 16 Stunden inkubiert. Hierbei lag der Antikörper gelöst in Tris, Natriumchlorid und Tween 20 (TBS/T) mit einer Verdünnung von 1:5000 vor. Inkubation in sekundärem Antikörper erfolgte am Folgetag für eine Stunde. Hierbei lag der Antikörper gelöst in TBS/T mit einer Verdünnung von 1:10000 vor.

2.3. Statistische Auswertung

Während des 13-tägigen Experiments (Tag 0 bis Tag 12) wurden bei den Versuchstieren die Parameter venöser Methämoglobinanteil, Körpergewicht und an Tag 12 zusätzlich das Muskelgewicht der Beine gemessen. Die Beurteilung dieser Parameter diente einerseits der Verlaufskontrolle und andererseits der Erfolgskontrolle des Tiermodells. Methämoglobinanteil und Körpergewicht wurden durch zweiseitige t-Tests auf Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen überprüft. Für das Muskelgewicht der Beine wurde ein Allgemeines Lineares Modell angewendet, um Effekte von Immobilisation, Inflammation und der Kombination beider Faktoren auf diese Parameter zu analysieren. Erwiesen sich Hauptfaktoren als signifikant, wurden anschließend Post-hoc Analysen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben.

Ergebnisse der Western Blots wurden quantifiziert und als absolute Werte in einem Datensatz gespeichert. Für die Analyse der Daten wurde ein Allgemeines Lineares Regressionsmodell mit Effekt der Hauptfaktoren Immobilisation, Inflammation und Insulin auf die Proteinkonzentration von Akt, pAkt, GSK3, pGSK3, GS und pGS im Muskel angewendet. Erwiesen sich Hauptfaktoren als signifikant, wurden anschließend Post-hoc Analysen durchgeführt, um Unterschiede zwischen Versuchsgruppen zu analysieren. Diese beinhalteten zusätzlich einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA), um unterschiedliche Effekte der Faktoren auf das kontralaterale und operierte Bein innerhalb einer Gruppe darstellen zu können. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Zur Organisation und Speicherung der Datensätze wurden Excel (Microsoft, USA) und SPSS Statistics 22 (IBM, USA) verwendet. Die Berechnungen wurden in Excel und SPSS Statistics 22 durchgeführt. Die Erstellung von Grafiken und Tabellen erfolgte mittels Excel, Word (Microsoft, USA), PowerPoint (Microsoft, USA) Publisher (Microsoft, USA) und SPSS Statistics 22.

3. Ergebnisse

3.1. Mortalitätsrate des Tiermodells

In der Kontroll- und Immobilisationsgruppe überlebten alle Tiere die Versuchsprozedur. Die Gruppen Inflammation und Kombination aus Immobilisation und Inflammation wiesen beide eine Mortalitätsrate in Höhe von 22 Prozent auf (verstorbene Tiere: Inflammation = 8 von 36; Kombination = 8 von 37).

3.2. Methämoglobin

In der Kontroll- und Immobilisationsgruppe war über den zwölfägigen Versuch kein Anstieg des Methämoglobins im Blut messbar (Mittlere Methämoglobinkonzentration: Kontrollgruppe = $0,3\% \pm 0,06\%$; Immobilisationsgruppe = $0,3\% \pm 0,06\%$).

In der Inflammation- und Kombinationsgruppe war der Methämoglobinspiegel an Tagen 4, 8 und 12 im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Mittlere Methämoglobinkonzentration: Inflammationsgruppe = $6,6\% \pm 3,4\%$; Kombinationsgruppe = $8,1\% \pm 3,0\%$).

Die Applikation von *Corynebacterium parvum* führte somit zu einem Anstieg der Methämoglobinkonzentration (**Abbildung 5**).

3.3. Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere entwickelte sich je nach Versuchsgruppe unterschiedlich (**Abbildung 6**). In der Kontroll- und Immobilisationsgruppe erhöhte sich das Gewicht über den Versuchszeitraum kontinuierlich (Mittlere Körpergewichtsdifferenz Tag 12 gegenüber Tag 0: Kontrollgruppe = $50\text{g} \pm 14\text{g}$; Immobilisationsgruppe = $36\text{g} \pm 11\text{g}$; $p < 0,001$). Somit waren in der Immobilisationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein geringerer Anstieg zu beobachten und schließlich an Tag 12 niedrigere Werte des Körpergewichts zu messen (Mittleres Körpergewicht Tag 12: Kontrollgruppe = $275\text{g} \pm 20\text{g}$; Immobilisationsgruppe = $261\text{g} \pm 16\text{g}$; $p = 0,001$).

In der Inflammations- und Kombinationsgruppe hingegen wurde insgesamt keine Gewichtszunahme beobachtet (Mittlere Körpergewichtsdifferenz Tag 12 gegenüber Tag 0: Inflammationsgruppe = $-1,6\text{g} \pm 14\text{g}$; Kombinationsgruppe = $-1,7\text{g} \pm 16\text{g}$; $p = 0,97$).

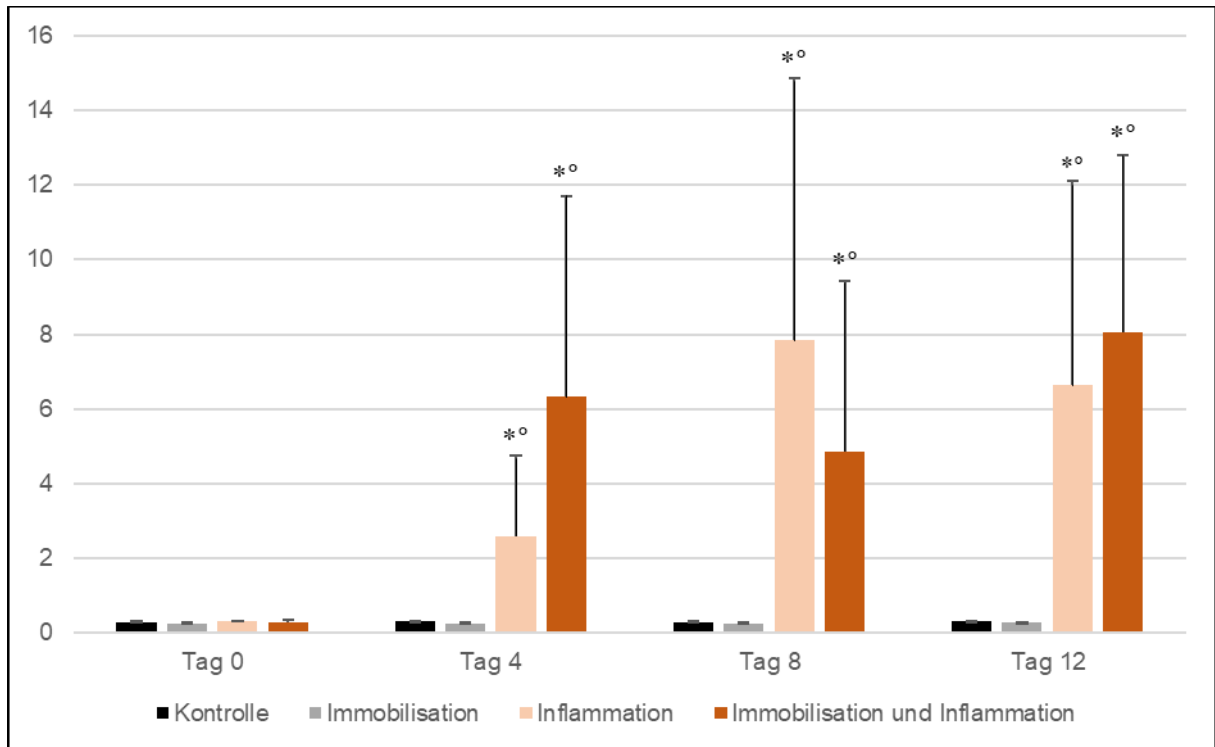


Abbildung 5: Methämoglobin im Blut der Versuchstiere an den Tagen 0, 4, 8 und 12

Methämoglobinkonzentration (Mittelwerte in Prozent + Standardabweichung) im Blut der Versuchstiere über die 13-tägige Versuchsdauer. In Inflammationsgruppen bewirkte die repetitive Injektion von *Corynebacterium parvum* an den Tagen 0, 4, 8 und 12 eine systemische Entzündungsreaktion.

* = signifikanter Unterschied gegenüber derselben Gruppe an Tag 0 ($p < 0,05$; zweiseitiger t-Test bei abhängigen Stichproben)

° = signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe desselben Tags ($p < 0,05$; zweiseitiger t-Test bei unabhängigen Stichproben)

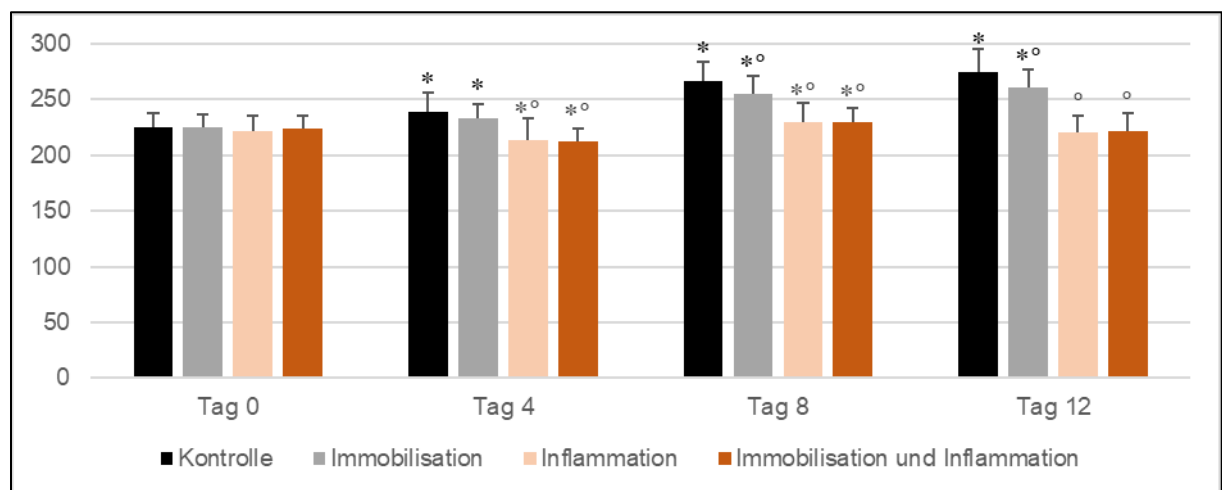


Abbildung 6: Körpergewicht der Versuchstiere an den Tagen 0, 4, 8 und 12

Körpergewicht (Mittelwerte in Gramm + Standardabweichung) der Versuchstiere über die 13-tägige Versuchsdauer. Die Gewichtszunahme in der Immobilisationsgruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer. In den Inflammationsgruppen ist insgesamt kein Anstieg des Körpergewichts zu beobachten.

* = signifikanter Unterschied gegenüber derselben Gruppe an Tag 0 ($p < 0,05$; zweiseitiger t-Test bei abhängigen Stichproben)

° = signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe desselben Tags ($p < 0,05$; zweiseitiger t-Test bei unabhängigen Stichproben)

3.4. Muskelgewicht

Immobilisation ($p < 0,001$), Inflammation ($p < 0,001$) und die Kombination aus Immobilisation und Inflammation ($p = 0,013$) zeigten einen signifikanten Effekt auf das Muskelgewicht der Beine. Innerhalb der Kontrollgruppe war das Muskelgewicht im sham-operierten Bein ($0,52\text{g} \pm 0,06\text{g}$) verglichen mit dem kontralateralen ($0,57\text{g} \pm 0,04\text{g}$) Bein erniedrigt ($p = 0,003$). Im Folgenden werden daher die Beinmuskelgewichte der Interventionsgruppen mit dem jeweiligen Bein der Kontrollgruppe verglichen, i. e. das kontralaterale Bein der Immobilisations-/Inflammations-/Kombinationsgruppe wird mit dem kontralateralen Bein der Kontrollgruppe verglichen, das operierte Bein der Immobilisations-/Inflammations-/Kombinationsgruppe wird mit dem operierten Bein der Kontrollgruppe verglichen (**Tabelle 2**).

Innerhalb der Immobilisationsgruppe war das Muskelgewicht des operierten Beins ($0,30\text{g} \pm 0,03\text{g}$) verglichen zur kontralateralen Seite ($0,53\text{g} \pm 0,03\text{g}$) vermindert ($p < 0,001$). Gegenüber dem sham-operierten Bein der Kontrollgruppe ist das Muskelgewicht des operierten Beins der Immobilisationsgruppe vermindert ($p < 0,001$). Im kontralateralen Bein der Immobilisationsgruppe war verglichen zum kontralateralen Bein der Kontrollgruppe ein Gewichtsverlust zu vermerken ($p < 0,001$), obwohl keine Intervention stattgefunden hatte. Innerhalb der Inflammationsgruppe war das Muskelgewicht im sham-operierten Bein ($0,38\text{g} \pm 0,07\text{g}$) gegenüber dem kontralateralen Bein ($0,44\text{g} \pm 0,05\text{g}$) vermindert ($p = 0,002$). Zudem war eine Abnahme des Muskelgewichts im kontralateralen und sham-operierten Bein im Vergleich zum jeweiligen Bein der Kontrollgruppe zu beobachten (kontralateral: $p < 0,001$; sham-operiert: $p < 0,001$).

Innerhalb der Kombinationsgruppe war das Muskelgewicht im operierten Bein ($0,23\text{g} \pm 0,03\text{g}$) gegenüber dem kontralateralen Bein ($0,43\text{g} \pm 0,05\text{g}$) vermindert ($p < 0,001$). Außerdem war in der Kombinationsgruppe das Muskelgewicht des operierten Beins geringer als das im operierten Bein der Immobilisationsgruppe ($p < 0,001$) und sham-operierten Bein der Inflammationsgruppe ($p < 0,001$). Im Vergleich zum jeweiligen Bein der Kontrollgruppe war eine Abnahme des Muskelgewichts im kontralateralen und operierten Bein zu beobachten (kontralateral: $p < 0,001$; operiert: $p < 0,001$).

Kontrolle		Immobilisation §		Inflammation #		Immobilisation und Inflammation §#	
cl	sham-op	cl	op	cl	sham-op	cl	op
0,57 ±0,04	0,52* ±0,06	0,53° ±0,03	0,30°* ±0,03	0,44° ±0,05	0,38°* ±0,07	0,43°& ±0,05	0,23°*+§ ±0,03

Tabelle 2: Muskelgewicht der kontralateralen und operierten Beine nach Gruppen

Veränderung des Muskelgewichts durch den Einfluss der Hauptfaktoren Immobilisation und Inflammation in Gramm (Mittelwerte ± Standardabweichung).

Abkürzungen:

(sham-) op = (schein-) operiertes Bein, **cl** = kontralaterales Bein.

§ = signifikanter Haupteffekt der Immobilisation auf die Proteinkonzentration ($p < 0,05$; allgemeines lineares Modell)

= signifikanter Haupteffekt der Inflammation auf die Proteinkonzentration ($p < 0,05$; allgemeines lineares Modell)

° = signifikanter Unterschied im Vergleich zum jeweiligen Bein der Kontrollgruppe ($p < 0,05$; zweiseitiger t-Test bei unabhängigen Stichproben)

* = signifikanter Unterschied im Vergleich zum kontralateralen Bein derselben Gruppe ($p < 0,05$; zweiseitiger t-Test bei abhängigen Stichproben)

& / + = signifikanter Unterschied des kontralateralen (&) oder operierten (+) Beins von Tieren mit Immobilisation und Inflammation im Vergleich zu Tieren mit alleiniger Immobilisation ($p < 0,05$ in der Post-hoc Analyse, wenn die Immobilisation des Hauptfaktors signifikant war)

§ = signifikanter Unterschied des operierten Beins von Tieren mit Immobilisation und Inflammation im Vergleich zu Tieren mit alleiniger Inflammation ($p < 0,05$ in der Post-hoc Analyse, wenn der Hauptfaktor Inflammation signifikant war)

3.5. Western Blot Analysen

Im Folgenden werden die Enzymkonzentrationen im Muskel gruppenintern (z. B. innerhalb der Immobilisationsgruppe) und gruppenübergreifend (z. B. zwischen Immobilisations- und Kontrollgruppe) gegenübergestellt. Bei gruppenübergreifenden Vergleichen wird das Bein der einen Gruppe stets dem jeweiligen Bein der anderen Gruppe gegenübergestellt, i. e. das kontralaterale Bein wird mit dem kontralateralen Bein, das operierte Bein mit dem (sham-) operierten Bein der jeweiligen Gruppe verglichen. Zusätzlich findet ein Vergleich zwischen NaCl- und Insulingruppen statt. Eine tabellarische Zusammenfassung dieser Ergebnisse befindet sich im Anschluss (**Tabelle 3**).

3.5.1. Akt

Immobilisation und Inflammation zeigten einen signifikanten Effekt auf Akt Konzentrationen (Immobilisation: $p < 0,001$; Inflammation: $p < 0,001$) im Muskelgewebe (**Abbildung 7**). Sowohl in NaCl- als auch in Insulingruppen wurden erhöhte Akt Konzentrationen unter dem Einfluss von Immobilisation und Inflammation beobachtet. Im operierten Bein der Kombinationsgruppe war eine gesteigerte Akt Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl: $p < 0,001$; Insulin: $p < 0,001$), Immobilisationsgruppe (NaCl: $p = 0,003$; Insulin: $p = 0,003$) und Inflammationsgruppe (NaCl: $p < 0,001$; Insulin: $p < 0,001$) zu verzeichnen. Die Kombination aus Immobilisation und Inflammation bewirkte somit eine stärkere Erhöhung der Akt Konzentration als beide Faktoren einzeln.

Ein Vergleich von NaCl- gegen Insulingabe zeigte keine Auswirkung durch Insulin auf die Akt Konzentration.

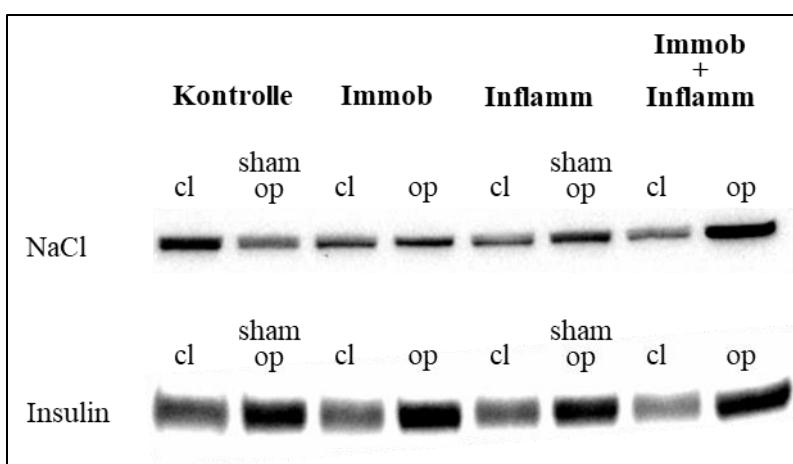


Abbildung 7: Akt Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe

Western Blot Ergebnis für Akt mit den Gruppen Kontrolle (**Kontrolle**), Immobilisation (**Immob**), Inflammation (**Inflamm**) und der Kombination aus Immobilisation und Inflammation (**Immob + Inflamm**) nach NaCl- und Insulingabe. Aus jeder Gruppe ist jeweils das kontralaterale (**cl**) neben dem sham-operierten (**sham op**) beziehungsweise operierten (**op**) Bein dargestellt.

3.5.2. Aktiviertes Akt (pAkt)

Immobilisation, Inflammation und Insulin zeigten einen signifikanten Effekt auf pAkt Konzentrationen (Immobilisation: $p < 0,001$; Inflammation: $p < 0,001$; Insulin: $p < 0,001$) im Muskelgewebe (**Abbildung 8**). In NaCl-Gruppen befanden sich die pAkt Konzentrationen unter der Nachweisgrenze.

In Insulingruppen wurde ein Anstieg der pAkt Konzentration unter Einfluss von Immobilisation und Inflammation beobachtet. In beiden Beinen der Kombinationsgruppe war eine vermehrte pAkt Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (kontralateral: $p = 0,001$; sham-operiert: $p < 0,001$), Immobilisationsgruppe (kontralateral: $p = 0,013$; operiert: $p < 0,001$) und Inflamationsgruppe (kontralateral: $p = 0,033$; sham-operiert: $p < 0,001$) zu verzeichnen. Die Kombination von Immobilisation und Inflammation führte daher zu höheren pAkt Konzentrationen als beide Faktoren einzeln.

Ein Vergleich von NaCl- gegen Insulingabe zeigte eine Erhöhung der pAkt Konzentration durch Insulin in beiden Beinen der Kontrollgruppe (kontralateral: $p < 0,001$; sham-operiert: $p < 0,001$), Immobilisationsgruppe (kontralateral: $p < 0,001$; operiert: $p < 0,001$), Inflamationsgruppe (kontralateral: $p < 0,001$; sham-operiert: $p < 0,001$) und Kombinationsgruppe (kontralateral: $p < 0,001$; operiert: $p < 0,001$). Insulinapplikation führte demnach in allen Gruppen zu einer Aktivierung von Akt zu pAkt.

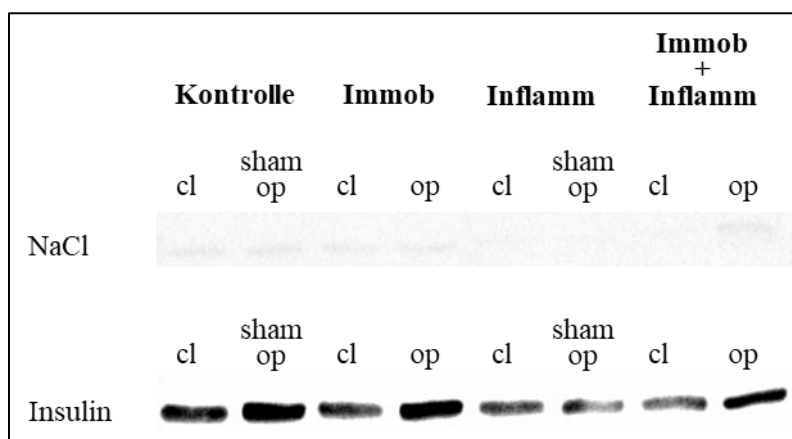


Abbildung 8: pAkt Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe

Western Blot Ergebnis für pAkt mit den Gruppen Kontrolle (**Kontrolle**), Immobilisation (**Immob**), Inflammation (**Inflamm**) und der Kombination aus Immobilisation und Inflammation (**Immob + Inflamm**) nach NaCl- und Insulingabe. Aus jeder Gruppe ist jeweils das kontralaterale (**cl**) neben dem sham-operierten (**sham op**) beziehungsweise operierten (**op**) Bein dargestellt.

3.5.3. Aktivierte Glykogensynthasekinase 3 Beta (GSK3)

Immobilisation, Inflammation und Insulin zeigten einen signifikanten Effekt auf GSK3 Konzentrationen (Immobilisation: $p < 0,001$; Inflammation: $p < 0,001$; Insulin: $p = 0,001$) im Muskelgewebe (**Abbildung 9**). In NaCl- und Insulingruppen waren erhöhte GSK3 Konzentrationen unter dem Einfluss von Immobilisation und Inflammation zu beobachten. Ferner wiesen beide Beine der Kombinationsgruppe eine erhöhte GSK3 Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; sham-operiert, NaCl: $p < 0,001$; sham-operiert, Insulin: $p < 0,001$), Immobilisationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; operiert, NaCl: $p < 0,001$; operiert, Insulin: $p < 0,001$) und Inflamationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; sham-operiert, NaCl: $p < 0,001$; sham-operiert, Insulin: $p < 0,001$) auf. Die Kombination aus Immobilisation und Inflammation führte somit in NaCl- und Insulingruppen zu einer höheren GSK3 Konzentration als beide Faktoren einzeln.

Vergleichsanalysen von NaCl- gegen Insulingabe zeigten eine Senkung der GSK3 Konzentration durch Insulin in beiden Beinen der Kontrollgruppe (kontralateral: $p = 0,027$; sham-operiert: $p = 0,029$) und im kontralateralen Bein der Immobilisationsgruppe ($p = 0,002$). Hingegen war im operierten Bein der Immobilisationsgruppe sowie in beiden Beinen der Inflamationsgruppe und Kombinationsgruppe kein Effekt durch Insulingabe zu beobachten. Somit führte die Insulinapplikation lediglich im „gesunden“ Muskel, i. e. ohne Immobilisation oder Inflammation, zu einer Senkung der GSK3 Konzentration.

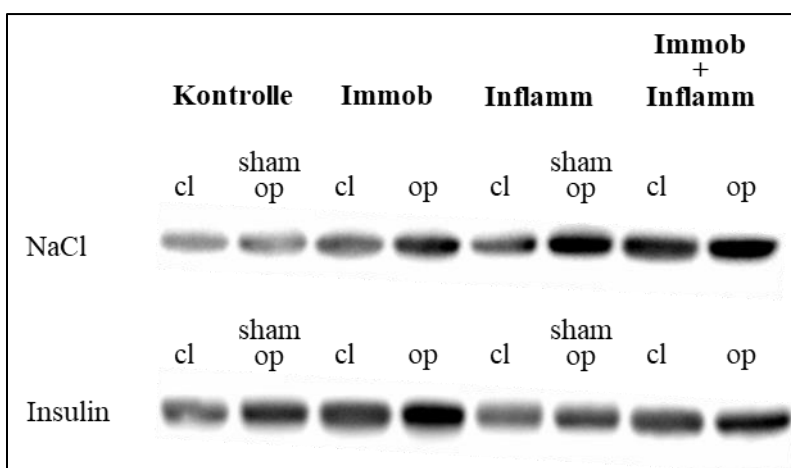


Abbildung 9: GSK3 Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe

Western Blot Ergebnis für GSK3 mit den Gruppen Kontrolle (**Kontrolle**), Immobilisation (**Immob**), Inflammation (**Inflamm**) und der Kombination aus Immobilisation und Inflammation (**Immob + Inflamm**) nach NaCl- und Insulingabe. Aus jeder Gruppe ist jeweils das kontralaterale (**cl**) neben dem sham-operierten (**sham op**) beziehungsweise operierten (**op**) Bein dargestellt.

3.5.4. Deaktivierte Glykogensynthasekinase 3 Beta (pGSK3)

Immobilisation, Inflammation und Insulin zeigten einen signifikanten Effekt auf pGSK3 Konzentrationen (Immobilisation: $p < 0,001$; Inflammation: $p < 0,001$; Insulin: $p < 0,001$) im Muskelgewebe (**Abbildung 10**). In NaCl- und Insulingruppen waren reduzierte pGSK3 Konzentrationen unter Immobilisation und Inflammation zu beobachten. Ferner wiesen beide Beine der Kombinationsgruppe eine reduzierte pGSK3 Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; sham-operiert, NaCl: $p < 0,001$; sham-operiert, Insulin: $p < 0,001$), Immobilisationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; operiert, NaCl: $p < 0,001$; operiert, Insulin: $p < 0,001$) und Inflamationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p = 0,001$; sham-operiert, NaCl: $p < 0,001$; sham-operiert, Insulin: $p < 0,001$) auf. Die Kombination aus Immobilisation und Inflammation bewirkte somit in NaCl- und Insulingruppen eine geringere Deaktivierung von GSK3 zu pGSK3 als beide Faktoren einzeln.

Vergleichsanalysen von NaCl- gegen Insulingabe zeigten eine Erhöhung der pGSK3 Konzentration durch Insulin in beiden Beinen der Kontrollgruppe (kontralateral: $p < 0,001$; sham-operiert: $p < 0,001$) und im kontralateralen Bein der Immobilisationsgruppe ($p < 0,001$). Hingegen war im operierten Bein der Immobilisationsgruppe sowie in beiden Beinen der Inflamationsgruppe und Kombinationsgruppe kein Effekt durch die Insulingabe zu beobachten. Demzufolge führte die Insulinapplikation lediglich im „gesunden“ Muskel zu einer Deaktivierung von GSK3 zu pGSK3.

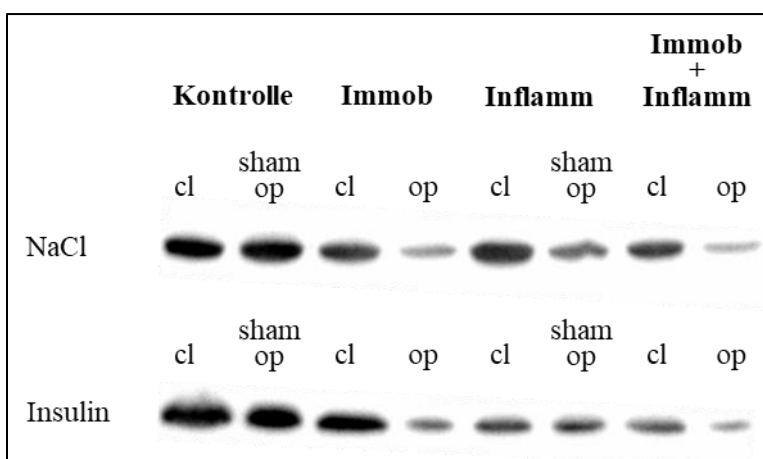


Abbildung 10: pGSK3 Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe

Western Blot Ergebnis für pGSK3 mit den Gruppen Kontrolle (**Kontrolle**), Immobilisation (**Immob**), Inflammation (**Inflamm**) und der Kombination aus Immobilisation und Inflammation (**Immob + Inflamm**) nach NaCl- und Insulingabe. Aus jeder Gruppe ist jeweils das kontralaterale (**cl**) neben dem sham-operierten (**sham op**) beziehungsweise operierten (**op**) Bein dargestellt.

3.5.5. Aktivierte Glykogensynthase (GS)

Immobilisation, Inflammation und Insulin hatten einen signifikanten Effekt auf GS Konzentrationen (Immobilisation: $p < 0,001$; Inflammation: $p < 0,001$; Insulin: $p < 0,001$) im Muskelgewebe (**Abbildung 11**). In NaCl- und Insulingruppen wurde eine Abnahme der GS Konzentration unter dem Einfluss von Immobilisation und Inflammation beobachtet. Ferner war in beiden Beinen der Kombinationsgruppe eine reduzierte GS Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; sham-operiert, NaCl: $p < 0,001$; sham-operiert, Insulin: $p = 0,002$), Immobilisationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p = 0,005$; operiert, NaCl: $p < 0,001$; operiert, Insulin: $p < 0,001$) und Inflamationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p = 0,001$; sham-operiert, NaCl: $p < 0,001$; sham-operiert, Insulin: $p = 0,005$) zu verzeichnen. Die Kombination aus Immobilisation und Inflammation führte somit in NaCl- und Insulingruppen zu einer niedrigeren GS Konzentration als beide Faktoren einzeln.

Vergleichsanalysen von NaCl- gegen Insulingabe zeigten eine Erhöhung der GS Konzentration durch Insulin in beiden Beinen der Kontrollgruppe (kontralateral: $p < 0,001$; sham-operiert: $p = 0,011$) und im kontralateralen Bein der Immobilisationsgruppe ($p = 0,019$). Hingegen hatte die Insulingabe im operierten Bein der Immobilisationsgruppe sowie in beiden Beinen der Inflamationsgruppe und Kombinationsgruppe keinen Effekt. Daher führte Insulinapplikation lediglich im „gesunden“ Muskel zu einer Erhöhung der GS Konzentration.

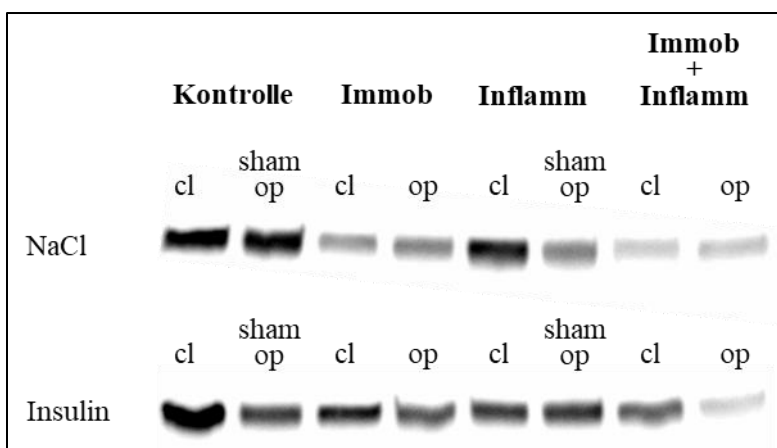


Abbildung 11: GS Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe

Western Blot Ergebnis für GS mit den Gruppen Kontrolle (**Kontrolle**), Immobilisation (**Immob**), Inflammation (**Inflamm**) und der Kombination aus Immobilisation und Inflammation (**Immob + Inflamm**) nach NaCl- und Insulingabe. Aus jeder Gruppe ist jeweils das kontralaterale (**cl**) neben dem sham-operierten (**sham op**) beziehungsweise operierten (**op**) Bein dargestellt.

3.5.6. Deaktivierte Glykogensynthase (pGS)

Immobilisation, Inflammation und Insulin zeigten einen signifikanten Effekt auf pGS Konzentrationen (Immobilisation: $p < 0,001$; Inflammation: $p < 0,001$; Insulin: $p < 0,001$) im Muskelgewebe (**Abbildung 12**). In NaCl- und Insulingruppen wurde ein Anstieg der pGS Konzentration unter dem Einfluss von Immobilisation und Inflammation beobachtet. Ferner wiesen beide Beine der Kombinationsgruppe eine erhöhte pGS Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (kontralateral, NaCl: $p < 0,001$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; sham-operiert, NaCl: $p = 0,005$; sham-operiert, Insulin: $p < 0,001$), Immobilisationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p = 0,011$; kontralateral, Insulin: $p < 0,001$; operiert, NaCl: $p = 0,005$; operiert, Insulin: $p = 0,020$) und Inflamationsgruppe (kontralateral, NaCl: $p = 0,020$; kontralateral, Insulin: $p = 0,003$; sham-operiert, NaCl: $p = 0,020$; sham-operiert, Insulin: $p < 0,001$) auf. Die Kombination von Immobilisation und Inflammation bewirkte daher in NaCl- und Insulingruppen eine stärkere Deaktivierung von GS zu pGS als beide Faktoren einzeln.

Ein Vergleich von NaCl- gegen Insulingabe zeigte eine Reduktion der pGS Konzentration durch Insulin in beiden Beinen der Kontrollgruppe (kontralateral: $p = 0,001$; sham-operiert: $p < 0,001$) und im kontralateralen Bein der Immobilisationsgruppe ($p < 0,001$). Im operierten Bein der Immobilisationsgruppe sowie in beiden Beinen der Inflamationsgruppe und Kombinationsgruppe hatte die Insulingabe keinen Effekt auf die pGS Konzentration. Daher führte Insulinapplikation lediglich im „gesunden“ Muskel zu einer Aktivierung von pGS zu GS.

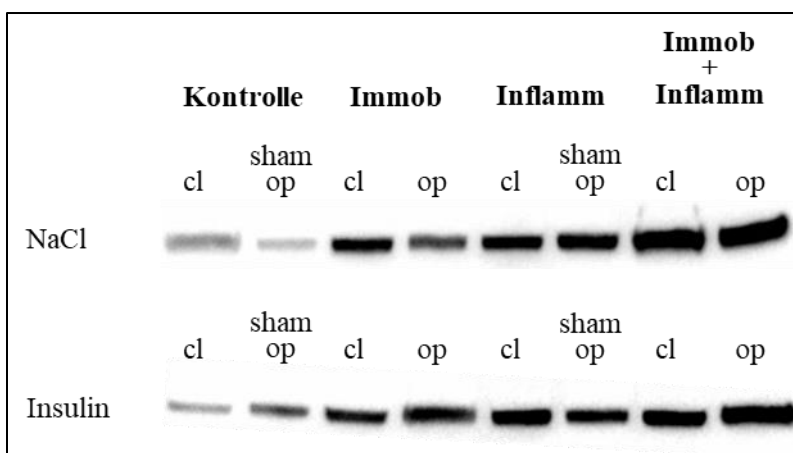


Abbildung 12: pGS Konzentration im Muskel nach NaCl- und Insulingabe

Western Blot Ergebnis für pGS mit den Gruppen Kontrolle (**Kontrolle**), Immobilisation (**Immob**), Inflammation (**Inflamm**) und der Kombination aus Immobilisation und Inflammation (**Immob + Inflamm**) nach NaCl- und Insulingabe. Aus jeder Gruppe ist jeweils das kontralaterale (**cl**) neben dem sham-operierten (**sham op**) beziehungsweise operierten (**op**) Bein dargestellt.

Gruppe	Kontrolle		Immobilisation		Inflammation		Immobilisation und Inflammation	
	cl	sham-op	cl	op	cl	sham-op	cl	op
Akt			§		#		§#	
NaCl	37 ± 11	44 ± 8	48 ± 8	80 ± 5*	53 ± 20*	55 ± 9	63 ± 15*	118 ± 18**\$
Insulin	38 ± 11	47 ± 9	41 ± 9	86 ± 9*	51 ± 14	60 ± 13	65 ± 9*&	122 ± 17**\$
pAkt			§		#		§#	
NaCl	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
Insulin	29 ± 17°	34 ± 15°	37 ± 15°	65 ± 19°*	46 ± 18°	51 ± 15°	67 ± 27°*%&	115 ± 29°**+\$
GSK3			§		#		§#	
NaCl	83 ± 8	87 ± 7	82 ± 10	124 ± 12*	104 ± 15*	98 ± 10*	138 ± 15*%&	199 ± 14**+\$
Insulin	74 ± 8°	78 ± 6°	74 ± 8°	117 ± 12*	96 ± 8*	94 ± 14*	134 ± 10*%&	200 ± 16**+\$
pGSK3			§		#		§#	
NaCl	90 ± 9	90 ± 12	86 ± 12	83 ± 14	82 ± 6	83 ± 9	54 ± 16*%&	48 ± 7**+\$
Insulin	115 ± 14°	120 ± 14°	116 ± 8°	87 ± 9*	92 ± 13*	91 ± 11*	60 ± 15*%&	52 ± 9**+\$
GS			§		#		§#	
NaCl	77 ± 13	71 ± 9	73 ± 14	69 ± 12	67 ± 5	65 ± 8	37 ± 7*%&	35 ± 10**+\$
Insulin	103 ± 15°	94 ± 27°	90 ± 23°	76 ± 8	70 ± 14*	68 ± 14*	43 ± 8*%&	40 ± 10**+\$
pGS			§		#		§#	
NaCl	51 ± 10	51 ± 16	53 ± 15	47 ± 17	67 ± 22	64 ± 15	82 ± 11*%&	91 ± 20**+\$
Insulin	27 ± 13°	27 ± 7°	29 ± 9°	48 ± 22*	62 ± 12*	58 ± 10*	87 ± 9*%&	83 ± 10**+\$

Tabelle 3: Proteinexpression im Insulinsignalweg des Muskels unter Immobilisation, Inflammation und Insulinstimulation

Konzentrationen (willkürliche Zahlen) von **Akt**, phosphoryliertem Akt (**pAkt**), Glykogensynthasekinase 3 Beta (**GSK3**), phosphorylierter Glykogensynthase-Kinase-3-beta (**pGSK3**), Glykogensynthase (**GS**) und phosphorylierter Glykogensynthase (**pGS**) im Western Blot dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. Abkürzungen:

(**sham-**) **op** = (schein-) operiertes Bein, **cl** = kontralaterales Bein, **NaCl** = Natriumchlorid.

§ = signifikanter Haupteffekt der Immobilisation auf die Proteinkonzentration ($p < 0,05$; allgemeines lineares Modell)

= signifikanter Haupteffekt der Inflammation auf die Proteinkonzentration ($p < 0,05$; allgemeines lineares Modell)

* = Signifikanter Unterschied im Vergleich zum jeweiligen Bein der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ in der Post-hoc Analyse, wenn der jeweilige Hauptfaktor Immobilisation oder Inflammation signifikant war)

° = signifikante Wirkung der Insulinbehandlung im Vergleich zum jeweiligen Bein ohne Insulin ($p < 0,05$ in der Post-hoc Analyse, wenn der jeweilige Hauptfaktor Insulin signifikant war)

& / + = signifikanter Unterschied des kontralateralen (&) oder operierten (+) Beins von Tieren mit Immobilisation und Inflammation im Vergleich zu Tieren mit alleiniger Immobilisation ($p < 0,05$ in der Post-hoc Analyse, wenn der Hauptfaktor Immobilisation signifikant war)

% / \$ = Signifikanter Unterschied des kontralateralen (%) oder operierten (\$) Beins von Tieren mit Immobilisation und Inflammation im Vergleich zu Tieren mit alleiniger Inflammation ($p < 0,05$ in der Post-hoc Analyse, wenn der Hauptfaktor Inflammation signifikant war)

3.5.7. Zusammenfassende Betrachtung des Insulinsignalwegs

Immobilisation und Inflammation induzierten einen Anstieg der Akt Konzentration im Skelettmuskel. Nach der Applikation von Insulin war eine erhöhte Konzentration aktivierter Akt (pAkt) zu verzeichnen, welche quantitativ dem Akt Anstieg entsprach. Infolgedessen bewirkte Insulin trotz Immobilisation und Inflammation eine erfolgreiche Aktivierung von Akt zu pAkt.

Darüber hinaus führten Immobilisation und Inflammation zu einem Anstieg der GSK3 Konzentration. Jedoch verblieben nach Insulingabe die Konzentrationen aktivierter GSK3 erhöht und deaktivierter GSK3 (pGSK3) erniedrigt, wenngleich ein erhöhter pAkt Spiegel vorlag. Folglich war die Insulinwirkung in diesem Abschnitt des Signalwegs beeinträchtigt. Weiter stromabwärts bewirkten Immobilisation und Inflammation eine Verminderung aktivierter GS und zugleich Erhöhung deaktivierter GS (pGS) Konzentrationen. Hierbei konnte nach Insulinapplikation kein Anstieg aktivierter GS oder Abnahme deaktivierter GS (pGS) beobachtet werden. Daher war der Insulinwirkung in diesem Abschnitt des Signalwegs ebenfalls eingeschränkt.

Im Muskel mit Immobilisation und Inflammation scheiterte somit die Insulinsignalwirkung im Schritt der GSK3 Deaktivierung durch pAkt. Diese Beeinträchtigung ist überdies im nachgeschalteten Abschnitt anhand der übermäßigen Deaktivierung von GS nachzuvollziehen (**Abbildung 13**).

Die quantitative Betrachtung der Enzymkonzentrationen zeigte einen unterschiedlichen Einfluss von Immobilisation und Inflammation in Abhängigkeit davon, ob diese Faktoren getrennt oder gemeinsam auftraten. Während Immobilisation und Inflammation separat allenfalls eine moderate Auswirkung auf die Akt, pAkt, GSK3, pGSK3, GS und pGS Konzentrationen im Skelettmuskel aufwiesen, bewirkte im Vergleich dazu die Kombination beider Faktoren eine deutliche Zunahme beziehungsweise Abnahme der Enzymkonzentrationen. Die Kombination von Immobilisation und Inflammation zeigte somit eine stärkere Beeinträchtigung des Insulinsignalwegs als beide Faktoren einzeln.

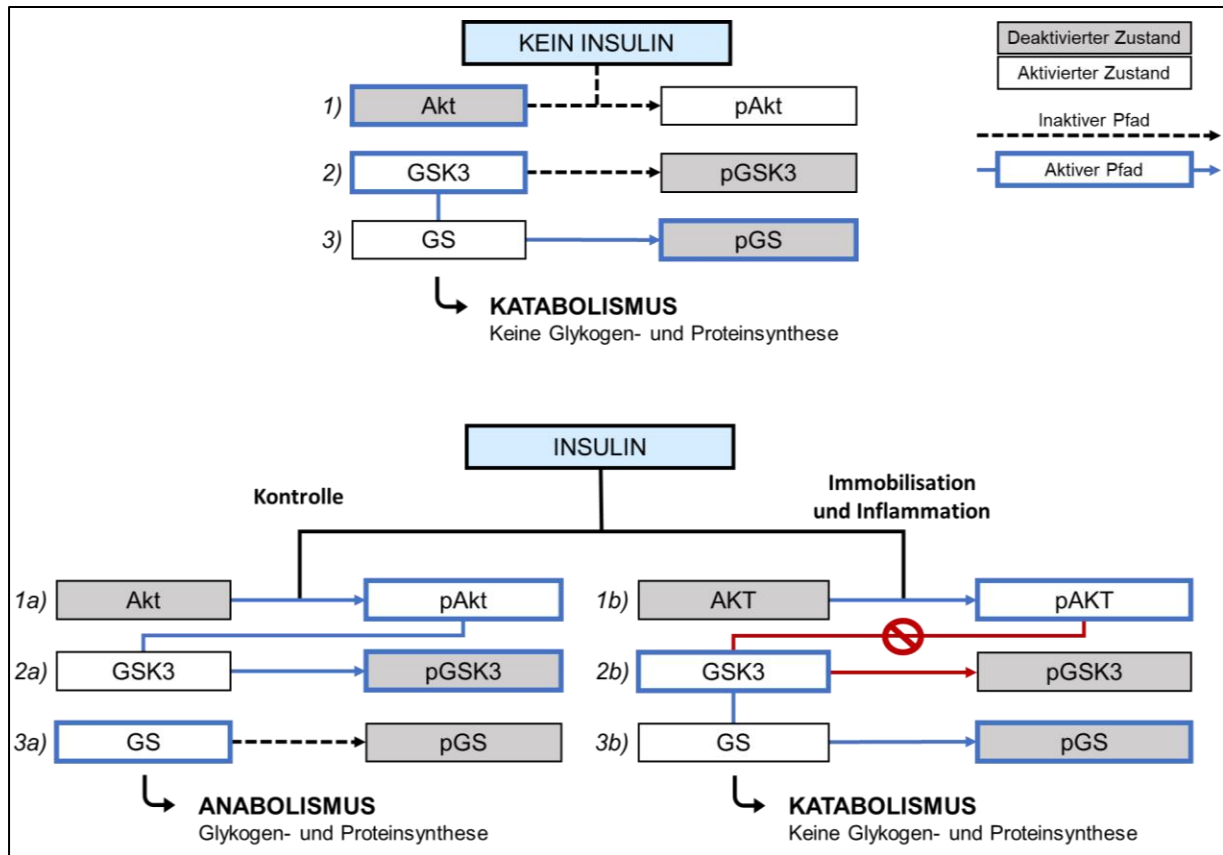


Abbildung 13: Der Akt-GSK3-GS Signalweg und dessen Beeinträchtigung unter Immobilisation und Inflammation

Kein Insulin (Kontroll- und Interventionsgruppen nach Kochsalzinjektion):

- 1) Akt ist im deaktivierten Zustand.
- 2) Durch die fehlende Hemmung von Akt verbleibt Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) im aktivierten Zustand und führt ihre konstitutive Enzymaktivität weiterhin aus.
- 3) Dies führt zu einer Deaktivierung von Glykogensynthase (GS) zu Phospho-Glykogensynthase (pGS).

Kontrolle (Kontrollgruppe nach Insulininjektion):

- 1a) Insulin bewirkt eine Aktivierung von Akt zu phosphoryliertem Akt (pAkt).
- 2a) Dies führt zur Deaktivierung von GSK3 zu Phospho-Glykogensynthase-Kinase 3 (pGSK3).
- 3a) Infolgedessen verbleibt GS im aktivierten Zustand und kann Glykogen synthetisieren.

Immobilisation und Inflammation (Interventionsgruppen nach Insulininjektion):

- 1b) Insulin bewirkt eine Aktivierung von Akt zu phosphoryliertem Akt (pAkt).
- 2b) Die Deaktivierung von GSK3 zu pGSK3 durch pAkt ist beeinträchtigt. Folglich verbleibt GSK3 im aktivierten Zustand.
- 3b) Dies führt zur Deaktivierung von GS zu pGS. Infolgedessen kann trotz Applikation von Insulin kein Glykogen synthetisiert werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte eine Beeinträchtigung des Insulinsignalwegs im Skelettmuskel und ein Muskelgewichtsverlust unter Einfluss der Faktoren Immobilisation und Inflammation demonstriert werden. Die Kombination beider Faktoren hatte einen additiven Effekt. Die Analyse des Akt-GSK3-GS Signalwegs zeigte eine erhaltene Akt Aktivierung bei beeinträchtigter GSK3 Deaktivierung und folglich einer vermehrten GS Deaktivierung.

4.1. Qualität des Double-hit Tiermodells

Die geringe Mortalitätsrate verdeutlicht die hohe Qualität des hier angewendeten Double-hit Rattenmodells. Immobilisation des Knie- und Sprunggelenks mittels Kirschner Draht hatte keine erhöhte Sterblichkeit der Versuchstiere zur Folge; dieses Ergebnis ist vergleichbar mit anderen Versuchsprozeduren zur Skelettmuskelatrophie unter Immobilisation (Caron et al. 2009; Onda et al. 2016). Die Erzeugung der systemischen Entzündungsreaktion mittels *Corynebacterium parvum* hingegen führte zu einem Anstieg der Sterblichkeit; jedoch konnte durch die hierbei verwendete Versuchsprozedur eine niedrigere Sterblichkeit der Versuchstiere erreicht werden verglichen mit herkömmlichen Tiermodellen zur Sepsis (Lewis et al. 2016).

Kontrollen des venösen Methämoglobins zeigten einen Anstieg dessen in Versuchstieren mit systemischer Entzündung, i. e. den Gruppen Inflammation sowie Kombination aus Immobilisation und Inflammation. Somit ist es gelungen durch Injektion von *Corynebacterium parvum* eine systemische Entzündungsreaktion in den Versuchstieren zu erzeugen. Die beobachteten Methämoglobinkonzentrationen waren hierbei ähnlich wie in früheren Modellen zur Immobilisation und Inflammation dieser Arbeitsgruppe (Fink et al. 2008). Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass die Inflammationsreaktion durch wiederholte Injektionen an Tagen 0, 4 und 8 über die 13-tägige Versuchsdauer aufrechterhalten werden konnte.

Bei frei zugänglicher Nahrung führte das 13-tägige Experiment in der Immobilisationsgruppe zu einer geringeren Körpergewichtszunahme als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis deutet auf einen eingeschränkten Anabolismus in immobilisierten Tieren hin, womöglich bedingt durch eine verminderte Gesamtaktivität. In Gruppen mit systemischer Inflammation hingegen war insgesamt keine Gewichtszunahme festzustellen, obwohl dieselben Umgebungsbedingungen herrschten. Dies weist auf eine gelungene systemische Entzündungsreaktion und der dadurch entstehenden katabolen Stoffwechsellage hin. Bezüglich der Körpergewichtsänderung sind die Ergebnisse ebenfalls konsistent zu Beobachtungen aus früheren Studien dieser Arbeitsgruppe (Fink et al. 2008).

Insgesamt konnten in dieser Studie eine geringe Mortalitätsrate sowie konsistente Entzündungs- und Gewichtsparameter verzeichnet werden. Somit kann von einer qualitativ hochwertigen Umsetzung des bereits etablierten Versuchsmodells zur Simulation einer ICUAW ausgegangen werden.

4.2. Skelettmuskelatrophie durch Immobilisation und Inflammation

Die Ergebnisse der Muskelgewichte verdeutlichen die Effektivität des Double-hit Tiermodells: Innerhalb von 13 Tagen konnte erfolgreich mithilfe der Faktoren Immobilisation und Inflammation ein Muskelschwund simuliert werden. Immobilisation zeigte eine seitenspezifische Auswirkung, was an der starken Reduktion des Muskelgewichts im betroffenen Bein zu erkennen ist. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien zur unilateralen Immobilisation mittels Draht (Fink et al. 2008) und Gips (Booth 1982; Kobayashi et al. 2006) überein. Inflammation hingegen wies einen systemischen Effekt auf, was an der Verminderung des Muskelgewichts in beiden Beinen deutlich wird. Auch in früheren Studien konnte in Zusammenhang mit Sepsis eine Abnahme des Muskelgewichts nachgewiesen werden (Voisin et al. 1996; Fink et al. 2008). Es bleibt allerdings unklar, ob dieser Gewichtsverlust durch die Entzündungsreaktion selbst oder eine verminderte Gesamtaktivität bedingt ist. Die Kombination von Immobilisation und Inflammation bewirkte den stärksten Muskelgewichtsverlust. Dies spricht für einen additiven Effekt beider Faktoren, welcher bereits in verwandten Studien dieser Arbeitsgruppe zu beobachten war (Fink et al. 2008).

Sham-Immobilisation führte zu einer geringgradigen, jedoch statistisch signifikanten, Abnahme des Muskelgewichts. Dies könnte durch eine Schonhaltung und Inaktivität des Beins bedingt sein, welche nach dem kurzzeitigen Trauma bei Erzeugung der Sham-Immobilisation bestand. Da Inaktivität in Abwesenheit von jeglichem Trauma bereits Muskelschwund bewirken kann (Khan et al. 2014), erscheint hier eine durch Sham-Immobilisation verursachte, leichtgradige Muskelatrophie plausibel.

4.3. Die Beeinträchtigung des Insulinsignalwegs durch Immobilisation und Inflammation

Im Rahmen des 13-tägigen Double-hit Tiermodells mit Immobilisation und Inflammation konnte eine Beeinträchtigung des Insulinsignalwegs im Skelettmuskel demonstriert werden. Darunter kam es zu erhöhten Konzentrationen von Akt, GSK3 und deaktivierter GS (pGS). Nach Insulinapplikation zeigte sich einerseits eine erhaltene Aktivierung von Akt zu pAkt, andererseits jedoch eine gestörte Deaktivierung von GSK3 zu pGSK3 und Aktivierung von pGS zu GS. Hierbei führte die Kombination aus Immobilisation und Inflammation zu einer stärkeren Beeinträchtigung als beide Faktoren einzeln.

Immobilisation und die Kombination aus Immobilisation und Inflammation führten in Abwesenheit von Insulin zur Erhöhung der Akt Expression im Skelettmuskel. Eine erhöhte mRNA-Expression von Akt konnte bereits in Ratten mit Sepsis (Crossland et al. 2008) und Patienten mit kritischer Krankheit (Constantin et al. 2011) nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse weisen auf eine Hochregulierung der Proteinexpression von Akt im Skelettmuskel während kritischer Krankheit hin. Die vermehrte Bereitstellung von Akt könnte eine vorkehrende Maßnahme der Muskelzelle darstellen, um bei einsetzender Insulinstimulation möglichst schnell dem intrazellulären Energiedefizit entgegenwirken zu können.

Die insulinabhängige Aktivierung von Akt induziert multiple anabole Stoffwechselwege in Skelettmuskelzellen (Manning und Toker 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhaltene insulinabhängige Akt Aktivierung zu pAkt beobachtet werden. In Patienten mit ICUAW wurde ebenfalls eine erhaltene Akt Aktivierung festgestellt (Jespersen et al. 2011; Weber-Carstens et al. 2013).

Im Gegensatz dazu wurde in Tiermodellen mit Verbrennungsverletzungen nach drei Tagen (Sugita et al. 2005) und chirurgischen Traumata mit Blutungen nach 60 Minuten (Thompson et al. 2008) eine beeinträchtigte Akt Aktivierung beobachtet. Hierbei spiegeln allerdings die angewendeten Tiermodelle nur teilweise die Bedingungen einer ICUAW wider. Unmittelbar posttraumatisch oder postinflammatorisch kann es durchaus zu einer eingeschränkten Akt Aktivierung im Muskel kommen (Costamagna et al. 2015), jedoch benötigt die Entwicklung einer kritischen Erkrankung mindestens mehrere Tage (Letter et al. 2001; Jonghe et al. 2002). Daher sollte diese zeitliche Komponente posttraumatisch und postinflammatorisch zur Beurteilung der Akt Aktivierung im Rahmen einer ICUAW miteinbezogen werden.

In der vorliegenden Studie wurde deshalb ein Tiermodell verwendet, welches die Umstände während der Entstehung einer ICUAW möglichst realistisch simuliert. Dies wurde umgesetzt

durch Berücksichtigung der wichtigsten Risikofaktoren, i. e. Immobilisation und Inflammation, einerseits und des benötigten Entstehungszeitraums einer ICUAW, i. e. 13-tägiger Versuchszeitraum, andererseits (Fink et al. 2008). In Zusammenschau kann deswegen von einer erhaltenen Akt Aktivierung während einer ICUAW ausgegangen werden.

Eine Stufe abwärts in der Insulinkaskade spielt GSK3 eine zentrale Rolle in der Regulierung der Glykogen- und Proteinsynthese des Skelettmuskels. In Gegenwart von Insulin wird GSK3 über aktiviertes Akt (pAkt) durch Phosphorylierung zu pGSK deaktiviert. Dies ermöglicht infolgedessen eine Glykogensynthese durch GS (Cross et al. 1995) und die Proteinsynthese durch den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2B (Welsh et al. 1998; Embi et al. 1980).

In der vorliegenden Studie lag in „gesundem“ Muskel, i. e. ohne Immobilisation und Inflammation, ein Gleichgewicht zwischen aktivierter und deaktivierter GSK3 vor. Immobilisation und Inflammation führten sowohl getrennt als auch in Kombination zu einem Anstieg aktivierter GSK3 gegenüber deaktivierter GSK3 (pGSK3). Erhöhte Konzentrationen aktivierter GSK3 wurden ebenfalls in kritisch kranken Patienten festgestellt, verbunden mit einer vermehrten GSK3-mRNA-Expression (Constantin et al. 2011). Eine denkbare Erklärung dafür wäre eine Hochregulierung der GSK3-Genexpression im Rahmen der systemischen Inflammation, da GSK3 bekanntermaßen Entzündungsreaktionen in diversen Erkrankungen fördert (Beurel et al. 2014; Jope et al. 2006) und die Zytokinproduktion reguliert (Martin et al. 2005). Eine Regulation der Inflammationsreaktion im Skelettmuskel durch die GSK3 ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht worden.

Zudem ist die GSK3 in der Lage deren eigene Aktivität durch Umwandlung von pGSK3 in aktivierte GSK3 über Proteinphosphatase 1 zu fördern (Beurel et al. 2014; Zhang et al. 2003). Somit kann eine initiale Erhöhung der GSK3 Konzentration zu einem weiteren, selbstinduzierten Anstieg derselben führen. In Abwesenheit von Insulin oder bei eingeschränktem Insulinsignalweg resultiert dies dementsprechend in einer Verschiebung des GSK3/pGSK3 Gleichgewichts in Richtung aktivierter GSK3 und dadurch einer verstärkten Inhibition der Protein- und Glykogensynthese im Skelettmuskel.

In „gesundem“ Muskel führte Insulinbehandlung zu einer Deaktivierung von GSK3. In Muskeln mit Immobilisation und Inflammation hingegen war der Insulinsignalweg in diesem Schritt beeinträchtigt. Infolgedessen entstand in Muskeln mit Immobilisation und Inflammation ein Überschuss an aktivierter GSK3 mit herabgesetzter Insulinsensitivität, deren Enzymfunktion jedoch erhalten blieb. Weiter abwärts in der Signalkaskade führte dies folglich zu einer bedeutsamen Deaktivierung der GS und somit einer Inhibition der Glykogensynthese. Zusätzlich ist durch die erhöhte Konzentration aktivierter GSK3 von einer

Hemmung der eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2B vermittelten Proteinsynthese auszugehen (Vary et al. 2002; Svanberg et al. 2000). Die vorliegende Studie zeigt somit, dass der Insulinsignalweg im Rahmen einer ICUAW im Abschnitt der GSK3 Deaktivierung gestört ist und trotz einer Applikation von Insulin nicht mehr reversibel ist. Die hierbei entstehende Hemmung der Glykogen- und Proteinsynthese verhindert schließlich effektiv anabole Stoffwechselwege im Skelettmuskel.

Aufgrund erhöhter aktivierter GSK3 Spiegel und deren erhaltenen Signalwirkung war die Konzentration von deaktivierter GS (pGS) im Muskel mit Immobilisation und Inflammation erhöht. Hierbei konnte Insulin im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Aktivierung der GS bewirken. Daher bestätigen diese Ergebnisse, dass die vorgeschaltete Beeinträchtigung der GSK3 Deaktivierung tatsächlich zu einer Insulinresistenz stromabwärts führte.

Trotz hoher aktivierter GSK3 Werte blieb ein gewisser Anteil an GS aktiviert, was auf einen komplexeren Regulationsmechanismus der Glykogensynthese hindeutet. In der Tat existiert eine insulinunabhängige Regulation der GS Aktivität durch allosterische Aktivierung über Glukose-6-phosphat (Bouskila et al. 2008; Bouskila et al. 2010). Dieser Regulationsmechanismus könnte die erhaltene GS Restkonzentration erklären. Die Erhöhung der GS Enzymkonzentration über den Insulinsignalweg blieb dennoch eingeschränkt.

Darüber hinaus ist eine Hemmung des AMPK Signalwegs durch aktivierte GSK3 bekannt (Suzuki et al. 2013). AMPK ist ein Regulator des zellulären Energiestoffwechsels (Mihaylova und Shaw 2011; Kim et al. 2016) und zudem essenziell für die GLUT4-Translokation zur Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel (Habegger et al. 2012; Sakamoto und Holman 2008; Long und Zierath 2006; Kurth-Kraczek et al. 1999). Bei erhöhter Konzentration aktivierter GSK3 ist somit auch von einer vermehrten Inhibition der AMPK auszugehen. Tatsächlich ist bei Patienten mit ICUAW eine beeinträchtigte AMPK Aktivierung mit verminderter GLUT4-Translokation bekannt (Weber-Carstens et al. 2013). Die durch Immobilisation und Inflammation verursachte Beeinträchtigung der insulinabhängigen GSK3 Deaktivierung hat daher nicht nur eine Inhibition der Glykogen- und Proteinsynthese, sondern möglicherweise auch eine Hemmung der zellulären Glukoseaufnahme zur Folge.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine verstärkte Beeinträchtigung des Insulinsignalwegs, wenn Immobilisation und Inflammation kombiniert auftraten. Daher könnte das gleichzeitige Vorhandensein beider Risikofaktoren zu einer erhöhten Insulinresistenz in kritisch Kranken führen. Dies hätte schließlich nicht nur einen verstärkten Energiemangel im Muskel, sondern auch eine Hyperglykämie zur Folge, welche die Entwicklung einer Polyneuropathie

begünstigt (Hermans et al. 2009). Das Ergebnis dieser Arbeit betont deshalb die Wichtigkeit der frühzeitigen Mobilisierung (Schweickert et al. 2009; Schaller et al. 2016), aggressiven Therapie der Sepsis und Kontrolle des Blutzuckerspiegels gemäß aktueller Fachempfehlungen (van den Berghe et al. 2006; Finfer et al. 2009), um der Entstehung einer ICUAW entgegenwirken zu können (Hermans und van den Berghe 2015).

Die vorliegende Studie hat einige Einschränkungen. Zwar ist dies die erste Studie, welche mittels Double-hit Rattenmodell das klinische Bild der ICUAW über einen Zeitraum von 13 Tagen simuliert und anschließend mit einer umfassenden Analyse des Insulinsignalwegs kombiniert. Dennoch ist das Tiermodell nicht vollständig auf die ICUAW übertragbar, da Risikofaktoren wie mechanische Beatmung (Jonghe et al. 2002), Unterernährung (Casaer und van den Berghe 2014), Arzneimittelwechselwirkungen (Price et al. 2016) nicht berücksichtigt werden. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit anhand zweier wichtiger Risikofaktoren, i. e. Immobilisation und systemische Inflammation, erfolgreich eine Insulinresistenz mit Muskelatrophie demonstriert werden.

Zweitens bleibt unklar, inwieweit die beobachtete Insulinresistenz für die Entwicklung der ICUAW verantwortlich ist oder ob umgekehrt die ICUAW ursächlich für die Insulinresistenz ist. Der Insulinsignalweg über Akt, GSK3 und GS stellt einen unter vielen anabolen Signalkaskaden dar, die für die Regulation des zellulären Energiestoffwechsels zuständig sind. Auch bestehen Interaktionen mit diversen anderen zellulären Signalwegen. Hierbei ist besonders die Verbindung zum RAS-ERK Signalweg relevant, da dieser Hand in Hand mit dem Akt-GSK3-GS Signalweg zelluläres Überleben und Stoffwechsel koordiniert (Moelling et al. 2002; Zimmermann und Moelling 1999). Die vorliegende Arbeit konnte mit Erfolg die Relevanz des Insulinsignalwegs im Rahmen einer ICUAW demonstrieren. Jedoch sind Kenntnisse über Interaktionen der Signalkaskaden unter kritischer Krankheit ungenügend, sodass eine Beteiligung weiterer Signalwege nicht auszuschließen ist. Es sind daher zusätzliche Studien hinsichtlich assoziierter Signalwege erforderlich, um die Rolle des Insulinsignalwegs in der Entstehung einer ICUAW abschließend definieren zu können.

5. Zusammenfassung

Immobilisation und Inflammation stellen Hauptrisikofaktoren für die auf Intensivstation erworbene Muskelschwäche (ICUAW) mit einhergehender Insulinresistenz dar. Der Einfluss dieser Faktoren auf den Insulinsignalweg im Skelettmuskel ist jedoch umstritten. Die vorliegende Arbeit untersucht den Effekt von Immobilisation und Inflammation auf den Insulinsignalweg im Skelettmuskel durch Analyse der insulinabhängigen Aktivierung von Akt und Phosphorylierung seiner nachgeschalteten Enzyme GSK3 und GS.

In einem Double-hit Rattenmodell wurden Versuchstiere in vier Gruppen eingeteilt: Kontrolle, Immobilisation, Inflammation und Kombination aus Immobilisation und Inflammation. Immobilisation erfolgte durch Fixierung von Knie- und Sprunggelenk eines Hinterbeins von Tag 0 bis 12. Die systemische Inflammation wurde durch intravenöse Injektionen von 56 mg/kg *Corynebacterium parvum* an den Tagen 0, 4 und 8 erreicht. An Tag 12 wurden die Versuchstiere ein weiteres Mal unterteilt, um entweder 0,65 IE/kg Insulin oder NaCl zu erhalten. Fünf Minuten später wurde beiden Beinen der *M. tibialis anterior* entnommen, gewogen und eingefroren. Danach erfolgte die Quantifizierung der Proteinkonzentration von Akt, GSK3 und GS mittels Immunoblot.

Im Vergleich zum Muskelgewicht des sham-operierten Beins der Kontrollgruppe ($0,52\text{g} \pm 0,06\text{g}$) wurde ein Muskelgewichtsverlust bei Immobilisation um 0,22g (95% KI 0.19-0.25g, $p < 0.001$), Inflammation um 0,14g (95% KI 0.11-0.17g, $p < 0.001$) und deren Kombination um 0,29g (95% KI 0.23-0.32g, $p < 0.001$) festgestellt. Immobilisation, Inflammation und deren Kombination erhöhten Akt, GSK3 und pGS Konzentrationen. pAkt Konzentrationen konnten in allen Gruppen mittels Insulinstimulation erhöht werden. Jedoch verblieben pGSK3 und GS Konzentrationen nach Insulingabe erniedrigt.

Immobilisation und Inflammation führten zu Muskelatrophie und Insulinresistenz. Der Insulinsignalweg ist bis zur Akt Aktivierung intakt, jedoch in der GSK3 Deaktivierung beeinträchtigt, was zu einem Überschuss an aktivierter GSK3 führt. Insulin kann folglich nicht mehr den erhöhten GSK3 Spiegel modulieren. Infolgedessen hemmt aktivierte GSK3 anabole Stoffwechselwege wie Glykogen- und Proteinsynthese. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle des Insulinsignalwegs in der Entwicklung einer ICUAW abschließend definieren zu können.

6. Referenzen

- 1 Alessi, D. R.; James, S. R.; Downes, C.; Holmes, A. B.; Gaffney, P. R.; Reese, C. B.; Cohen, P. (1997): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. In: *Current Biology* 7 (4), S. 261–269.
- 2 Beurel, E.; Grieco, S. F.; Jope, R. S. (2014): Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. In: *Pharmacology & therapeutics* 0, S. 114–131.
- 3 Bio-Rad Laboratories (2021): General Protocol for Western Blotting. Online verfügbar unter https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6376.pdf, zuletzt geprüft am 29.01.2021.
- 4 Booth, F. W. (1982): Effect of limb immobilization on skeletal muscle. In: *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 52 (5), S. 1113–1118.
- 5 Bouskila, M.; Hirshman, M. F.; Jensen, J.; Goodyear, L. J.; Sakamoto, K. (2008): Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 294 (1), E28–35.
- 6 Bouskila, M.; Hunter, R. W.; Ibrahim, A. F. M.; Delattre, L.; Peggie, M.; van Diepen, J. A. et al. (2010): Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. In: *Cell metabolism* 12 (5), S. 456–466.
- 7 Caron, A. Z.; Drouin, G.; Desrosiers, J.; Trenz, F.; Grenier, G. (2009): A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 106 (6), S. 2049–2059.
- 8 Casaer, M. P.; van den Berghe, G. (2014): Nutrition in the acute phase of critical illness. In: *The New England journal of medicine* 370 (13), S. 1227–1236.
- 9 Cell Signaling Technology (2021): Western Blotting Protocol Cell Signaling Technology | Cell Signaling Technology, zuletzt aktualisiert am 29.01.2021, zuletzt geprüft am 29.01.2021.
- 10 Chambers, M. A.; Moylan, J. S.; Reid, M. B. (2009): Physical inactivity and muscle weakness in the critically ill. In: *Critical care medicine* 37 (10 Suppl), S337–46.
- 11 Cho, H.; Mu, J.; Kim, J. K.; Thorvaldsen, J. L.; Chu, Q.; Crenshaw, E. B. et al. (2001): Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). In: *Science (New York, N.Y.)* 292 (5522), S. 1728–1731.
- 12 Constantin, D.; McCullough, J.; Mahajan, R. P.; Greenhaff, P. L. (2011): Novel events in the molecular regulation of muscle mass in critically ill patients. In: *The Journal of Physiology* 589 (Pt 15), S. 3883–3895.
- 13 Costamagna, D.; Costelli, P.; Sampaolesi, M.; Penna, F. (2015): Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis. In: *Mediators of inflammation* 2015, S. 805172.

- 14 Cross, D. A. E.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A. (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. In: *Nature* 378 (6559), S. 785–789.
- 15 Crossland, H.; Constantin-Teodosiu, D.; Gardiner, S. M.; Constantin, D.; Greenhaff, P. L. (2008): A potential role for Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle. In: *The Journal of Physiology* 586 (Pt 22), S. 5589–5600.
- 16 Crossland, H.; Skirrow, S.; Puthuchery, Z. A.; Constantin-Teodosiu, D.; Greenhaff, P. L. (2019): The impact of immobilisation and inflammation on the regulation of muscle mass and insulin resistance: different routes to similar end-points. In: *The Journal of Physiology* 597 (5), S. 1259–1270.
- 17 Embi, N.; Rylatt, D. B.; Cohen, P. (1980): Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. In: *European journal of biochemistry* 107 (2), S. 519–527.
- 18 Farquhar, D.; Benvenuto, J. A.; Kuttesch, N.; Loo, T. (1983): Inhibition of hepatic drug metabolism in the rat after *Corynebacterium parvum* treatment. In: *Biochemical pharmacology* 32 (7), S. 1275–1280.
- 19 Finfer, S.; Chittock, D. R.; Su, S. Y.-S.; Blair, D.; Foster, D.; Dhingra, V. et al. (2009): Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. In: *The New England journal of medicine* 360 (13), S. 1283–1297.
- 20 Fink, H.; Helming, M.; Unterbuchner, C.; Lenz, A.; Neff, F.; Martyn, J. A. J.; Blobner, M. (2008): Systemic inflammatory response syndrome increases immobility-induced neuromuscular weakness. In: *Critical care medicine* 36 (3), S. 910–916.
- 21 Fink, H.; Lupp, P.; Mayer, B.; Rosenbrock, H.; Metzger, J.; Martyn, J. A. J.; Blobner, M. (2003): Systemic inflammation leads to resistance to atracurium without increasing membrane expression of acetylcholine receptors. In: *Anesthesiology* 98 (1), S. 82–88.
- 22 Friedrich, O.; Reid, M. B.; van den Berghe, G.; Vanhorebeek, I.; Hermans, G.; Rich, M. M.; Larsson, L. (2015): The Sick and the Weak. Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill. In: *Physiological reviews* 95 (3), S. 1025–1109.
- 23 Garofalo, R. S.; Orena, S. J.; Rafidi, K.; Torchia, A. J.; Stock, J. L.; Hildebrandt, A. L. et al. (2003): Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. In: *Journal of Clinical Investigation* 112 (2), S. 197–208.
- 24 Glass, D. J. (2010): PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. In: *Current topics in microbiology and immunology* 346, S. 267–278.
- 25 Habegger, K. M.; Hoffman, N. J.; Ridenour, C. M.; Brozinick, J. T.; Elmendorf, J. S. (2012): AMPK Enhances Insulin-Stimulated GLUT4 Regulation via Lowering Membrane Cholesterol. In: *Endocrinology* 153 (5), S. 2130–2141.
- 26 Hermans, G.; Jonghe, B. de; Bruyninckx, F.; van den Berghe, G. (2009): Interventions for preventing critical illness polyneuropathy and critical illness myopathy. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (1), CD006832.

- 27 Hermans, G.; van den Berghe, G. (2015): Clinical review. Intensive care unit acquired weakness. In: *Critical care (London, England)* 19, S. 274.
- 28 Hermans, G.; Wilmer, A.; Meersseman, W.; Milants, I.; Wouters, P. J.; Bobbaers, H. et al. (2007): Impact of intensive insulin therapy on neuromuscular complications and ventilator dependency in the medical intensive care unit. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 175 (5), S. 480–489.
- 29 Huang, S.; Czech, M. P. (2007): The GLUT4 glucose transporter. In: *Cell metabolism* 5 (4), S. 237–252.
- 30 Iwashyna, T. J.; Ely, E. W.; Smith, D. M.; Langa, K. M. (2010): Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. In: *JAMA* 304 (16), S. 1787–1794.
- 31 Jespersen, J. G.; Nedergaard, A.; Reitelseder, S.; Mikkelsen, U. R.; Dideriksen, K. J.; Agergaard, J. et al. (2011): Activated protein synthesis and suppressed protein breakdown signaling in skeletal muscle of critically ill patients. In: *PloS one* 6 (3), e18090.
- 32 Johnson, M. (2012): Loading Controls for Western Blots. In: *MATER METHODS* 2.
- 33 Jonghe, B. de; Sharshar, T.; Lefaucheur, J.-P.; Authier, F.-J.; Durand-Zaleski, I.; Boussarsar, M. et al. (2002): Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. In: *JAMA* 288 (22), S. 2859–2867.
- 34 Jope, R. S.; Yuskaitis, C. J.; Beurel, E. (2006): Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. In: *Neurochemical research* 32 (4-5), S. 577–595.
- 35 Khan, M. A. S.; Sahani, N.; Neville, K. A.; Nagashima, M.; Lee, S.; Sasakawa, T. et al. (2014): Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 92 (1), S. 1–8.
- 36 Kim, J.; Yang, G.; Kim, Y.; Kim, J.; Ha, J. (2016): AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. In: *Experimental & molecular medicine* 48, e224.
- 37 Kobayashi, H.; Kato, H.; Hirabayashi, Y.; Murakami, H.; Suzuki, H. (2006): Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. In: *The Journal of nutrition* 136 (1 Suppl), 234S-6S.
- 38 Kress, J. P.; Hall, J. B. (2014): ICU-acquired weakness and recovery from critical illness. In: *The New England journal of medicine* 370 (17), S. 1626–1635.
- 39 Kurth-Kraczek, E. J.; Hirshman, M. F.; Goodyear, L. J.; Winder, W. W. (1999): 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. In: *Diabetes* 48 (8), S. 1667–1671.
- 40 Latronico, N.; Bolton, C. F. (2011): Critical illness polyneuropathy and myopathy. A major cause of muscle weakness and paralysis. In: *The Lancet Neurology* 10 (10), S. 931–941.
- 41 Leto, D.; Saltiel, A. R. (2012): Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (6), S. 383–396.

- 42 Letter, M.-A. de; Schmitz, P. I.; Visser, L. H.; Verheul, F. A.; Schellens, R. L.; Coul, D. A. o. de; van der Meché, F. G. (2001): Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients. In: *Critical care medicine* 29 (12), S. 2281–2286.
- 43 Lewis, A. J.; Seymour, C. W.; Rosengart, M. R. (2016): Current Murine Models of Sepsis. In: *Surgical Infections* 17 (4), S. 385–393.
- 44 Long, Y. C.; Zierath, J. R. (2006): AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (7), S. 1776–1783.
- 45 Macfarlane, I. A.; Rosenthal, F. D. (1977): Severe myopathy after status asthmaticus. In: *The Lancet* 310 (8038), S. 615.
- 46 Maltzahn, J. von; Chang, N. C.; Bentzinger, C. F.; Rudnicki, M. A. (2012): Wnt signaling in myogenesis. In: *Trends in cell biology* 22 (11), S. 602–609.
- 47 Manning, B. D.; Toker, A. (2017): AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. In: *Cell* 169 (3), S. 381–405.
- 48 Martin, M.; Rehani, K.; Jope, R. S.; Michalek, S. M. (2005): Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. In: *Nature immunology* 6 (8), S. 777–784.
- 49 McManus, E. J.; Sakamoto, K.; Armit, L. J.; Ronaldson, L.; Shpiro, N.; Marquez, R.; Alessi, D. R. (2005): Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. In: *The EMBO journal* 24 (8), S. 1571–1583.
- 50 Mihaylova, M. M.; Shaw, R. J. (2011): The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. In: *Nature cell biology* 13 (9), S. 1016–1023.
- 51 Moelling, K.; Schad, K.; Bosse, M.; Zimmermann, S.; Schweneker, M. (2002): Regulation of Raf-Akt Cross-talk. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (34), S. 31099–31106.
- 52 Onda, A.; Kono, H.; Jiao, Q.; Akimoto, T.; Miyamoto, T.; Sawada, Y. et al. (2016): New mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. In: *Muscle & nerve* 54 (4), S. 788–791.
- 53 Papazian, L.; Forel, J.-M.; Gacouin, A.; Penot-Ragon, C.; Perrin, G.; Loundou, A. et al. (2010): Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. In: *The New England journal of medicine* 363 (12), S. 1107–1116.
- 54 Price, D. R.; Mikkelsen, M. E.; Umscheid, C. A.; Armstrong, E. J. (2016): Neuromuscular Blocking Agents and Neuromuscular Dysfunction Acquired in Critical Illness: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Critical care medicine* 44 (11), S. 2070–2078.
- 55 Sakamoto, K.; Holman, G. D. (2008): Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295 (1), E29-37.

- 56 Schaller, S. J.; Anstey, M.; Blobner, M.; Edrich, T.; Grabitz, S. D.; Gradwohl-Matis, I. et al. (2016): Early, goal-directed mobilisation in the surgical intensive care unit: a randomised controlled trial. In: *The Lancet* 388 (10052), S. 1377–1388.
- 57 Schefold, J. C.; Bierbrauer, J.; Weber-Carstens, S. (2010): Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 1 (2), S. 147–157.
- 58 Schweickert, W. D.; Pohlman, M. C.; Pohlman, A. S.; Nigos, C.; Pawlik, A. J.; Esbrook, C. L. et al. (2009): Early physical and occupational therapy in mechanically ventilated, critically ill patients. A randomised controlled trial. In: *The Lancet* 373 (9678), S. 1874–1882.
- 59 Stitt, T. N.; Drujan, D.; Clarke, B. A.; Panaro, F.; Timofeyva, Y.; Kline, W. O. et al. (2004): The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. In: *Molecular cell* 14 (3), S. 395–403.
- 60 Sugita, H.; Kaneki, M.; Sugita, M.; Yasukawa, T.; Yasuhara, S.; Martyn, J. A. J. (2005): Burn injury impairs insulin-stimulated Akt/PKB activation in skeletal muscle. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288 (3), E585-91.
- 61 Suzuki, T.; Bridges, D.; Nakada, D.; Skiniotis, G.; Morrison, S. J.; Lin, J. et al. (2013): Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3. In: *Molecular cell* 50 (3), S. 407–419.
- 62 Svanberg, E.; Frost, R. A.; Lang, C. H.; Isgaard, J.; Jefferson, L. S.; Kimball, S. R.; Vary, T. C. (2000): IGF-I/IGFBP-3 binary complex modulates sepsis-induced inhibition of protein synthesis in skeletal muscle. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 279 (5), E1145-58.
- 63 Thompson, L. H.; Kim, H. T.; Ma, Y.; Kokorina, N. A.; Messina, J. L. (2008): Acute, muscle-type specific insulin resistance following injury. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 14 (11-12), S. 715–723.
- 64 van den Berghe, G.; Wilmer, A.; Hermans, G.; Meersseman, W.; Wouters, P. J.; Milants, I. et al. (2006): Intensive insulin therapy in the medical ICU. In: *The New England journal of medicine* 354 (5), S. 449–461.
- 65 van den Berghe, G.; Wouters, P.; Weekers, F.; Verwaest, C.; Bruyninckx, F.; Schetz, M. et al. (2001): Intensive insulin therapy in critically ill patients. In: *The New England journal of medicine* 345 (19), S. 1359–1367.
- 66 Vary, T. C.; Deiter, G.; Kimball, S. R. (2002): Phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF2Bepsilon in skeletal muscle during sepsis. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283 (5), E1032-9.
- 67 Veihelmann, A.; Brill, T.; Blobner, M.; Scheller, I.; Mayer, B.; Prölls, M. et al. (1997): Inhibition of nitric oxide synthesis improves detoxication in inflammatory liver dysfunction in vivo. In: *The American journal of physiology* 273 (2 Pt 1), G530-6.
- 68 Voisin, L.; Breuillé, D.; Combaret, L.; Pouyet, C.; Taillandier, D.; Arousseau, E. et al. (1996): Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the

activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. In: *Journal of Clinical Investigation* 97 (7), S. 1610–1617.

69 Weber-Carstens, S.; Schneider, J.; Wollersheim, T.; Assmann, A.; Bierbrauer, J.; Marg, A. et al. (2013): Critical illness myopathy and GLUT4. Significance of insulin and muscle contraction. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 187 (4), S. 387–396.

70 Welsh, G. I.; Miller, C. M.; Loughlin, A. J.; Price, N. T.; Proud, C. G. (1998): Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. In: *FEBS letters* 421 (2), S. 125–130.

71 Zhang, F.; Phiel, C. J.; Spece, L.; Gurvich, N.; Klein, P. S. (2003): Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (35), S. 33067–33077.

72 Zimmermann, S.; Moelling, K. (1999): Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5445), S. 1741–1744.

7. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Gerhard Schneider, Direktor der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München, und Prof. Dr. med. Eberhard Kochs, ehemaliger Direktor der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München, für die zur Verfügung gestellten Rahmenbedingungen bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. med. Heidrun Lewald und meinem Mentor Prof. Dr. med. Stefan Schaller. Beiden möchte ich herzlichst für ihre äußerst engagierte Unterstützung meines Promotionsvorhabens danken. Sie ermöglichten mir den Zugang zur medizinischen Forschung und begleiteten mich auf dem gesamten Weg der Dissertation stets mit gutem Rat, schnellem Feedback und vielseitigem Mentoring. Insbesondere verdanke ich ihnen die Kongressteilnahme in Orlando, welche dank ihres enthusiastischen Mentorings zu einer unvergesslichen Erfahrung für mich wurde. Auch möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. med. Manfred Blobner für seine wertvollen Ratschläge danken.

Außerdem danke ich sehr Andreas Blaschke für die Einarbeitung und seiner essenziellen Unterstützung im Labor. Danke für die praktische und oftmals seelische Unterstützung während dieser intensiven Zeit. Auch möchte ich in diesem Zusammenhang Fabian Schulz für seine wertvolle Unterstützung danken.

Des Weiteren möchte ich meiner Wanda für ihre äußerst nützlichen Hinweise zu dieser Arbeit danken, sowie der mir liebevoll entgegengebrachten Unterstützung und Geduld bei der Verfolgung meiner akademischen Ziele.

Zu guter Letzt möchte ich vom ganzen Herzen meinen Eltern danken. Mit ihrer bedingungslosen und unendlichen Unterstützung ermöglichten sie mir die Verwirklichung meiner Interessen.

8. Anhang

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Gan
 Vorname: Chunquan Thomas
 Geburtsdatum: 06.08.1995
 Geburtsort: München, Deutschland
 E-Mail: thomas.gan95@live.de

Ausbildung

10/2013 – 11/2020	<p>Medizinstudium: Ludwig-Maximilians-Universität (LMU, Vorklinik) und Technische Universität München (TUM, Klinik)</p> <p>Auslandaufenthalte:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tongj Hospital Wuhan (Huazhong Universität) • Tygerberg Hospital Kapstadt (Stellenbosch Universität) • Universitätsspital Zürich und ETH Zürich
11/2015 – aktuell	<p>Promotion: Experimentelle Doktorarbeit Anästhesie und Intensivmedizin</p> <ul style="list-style-type: none"> • Titel: Die Bedeutung des Insulinsignalwegs für eine auf der Intensivstation erworbenen Muskelschwäche (ICUAW) • 3. Platz Abstraktwettbewerb, Jahreskongress der American Society of Anesthesiologists (Orlando, 2019)
10/2019 – aktuell	<p>Master in Management and Technology:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Technische Universität München (TUM) • Ingenieurwissenschaftlicher Schwerpunkt: Energietechnik (major) • Angestrebter Abschluss: Master of Science (M.Sc.)
10/2016 – 03/2019	<p>B.Sc. Management and Technology:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Technische Universität München (TUM) • Ingenieurwissenschaftlicher Schwerpunkt: Elektro- und Informationstechnik
2005 – 2013	<p>Abitur:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Michaeli Gymnasium München • Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)-Preis für den jahrgangsbesten Abiturienten im Fach Chemie am Michaeli Gymnasium München

München, 08.03.2021

Thomas Gan