

3 Einleitung

Herzkreislauffunktionen sind die Haupttodesursache in Industrienationen. Um hier präventiv handeln zu können, ist ein molekulares Verständnis vom Aufbau und Funktion des Herzmuskels unumgänglich. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zum Verständnis der diastolischen Funktion des Herzen geleistet werden, die durch das Protein Titin moduliert wird.

Titin (alias Connectin) wurde Ende der 70er Jahre von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt (Wang et al., 1979; Maruyama et al., 1977). Es ist nach Myosin (43%) und Aktin (22%) das dritthäufigste Muskelprotein (8-10% der Muskelmasse) (Yates and Greaser, 1983). Mit einem Molekulargewicht von 3-3,7 MDa und einer Länge von bis zu 1 μm ist es das größte bekannte Protein (Maruyama et al., 1984; Bang et al., 2001a; Kurzban and Wang, 1988).

Durch die Integration in die Z-Scheibe und M-Linie des Sarkomers bildet Titin ein kontinuierliches elastisches Filamentsystem (Furst et al., 1988). Dessen mechanische Eigenschaften werden durch die Expression von unterschiedlichen Titin-Isoformen mit variablen elastischen Regionen bestimmt (N2B und PEVK Domäne) (Cazorla et al., 2000; Neagoe et al., 2003; Trombitas et al., 2000a; Wu et al., 2002; Freiburg et al., 2000). Die N2B Domäne ist ein herzspezifisches Federelement (Helmes et al., 1999; Trombitas et al., 1999) welches durch ein einziges Exon kodiert wird. Sie kann durch Phosphorylierung in ihrer Elastizität verändert werden (Yamasaki et al., 2002). Die PEVK Domäne besteht aus mehreren Exons. Diese können unterschiedlich gespleißt werden, und besitzen ebenfalls elastische Funktion (Gutierrez-Cruz et al., 2001; Linke et al., 1998a; Ma et al., 2001; Trombitas et al., 1998a). Im Herzen kann die PEVK-Region zusätzlich durch Interaktion mit Aktin als molekulare Bremse wirken (Kulke et al., 2001).

Erst in den letzten 5 Jahren wurde die Bedeutung von Titin als Strukturprotein auch durch Tiermodelle und Patienten mit Titin-Defizienz belegt. Mutationen im Titin-Gen können zur Entstehung von Herzkrankheiten beitragen (Gerull et al., 2002; Hein and Schaper, 2002; Itoh-Satoh et al., 2002; Matsumoto et al., 2006). Studien am dilatativen humanen Herzen und im Hypertrophiemodell an Ratten zeigten weiter, dass das Isoformenverhältnis von Titin verändert werden kann und hierdurch die Elastizität des Sarkomers und damit des Muskels beeinflusst wird (Makarenko et al.,

2004; Warren et al., 2003a). Der Anteil der N2B und PEVK-Region an den mechanischen Eigenschaften des Herzmuskels wurde bisher nicht untersucht.

3.1 Das Herz

Das Herz ist das erste funktionsfähige Organ im sich entwickelnden Organismus. Die Aufgabe dieses Hohlmuskels ist es, durch rhythmische Kontraktion das mit Sauerstoff angereicherte Blut aus der Lunge in die Arterien des Körperkreislaufs zu pumpen und damit die Verteilung der Nährstoffe und Abtransport von nicht mehr benötigten Stoffwechselprodukten zu gewährleisten. Das entstandene Kohlendioxid (CO_2) wird über die Lungen an die Umwelt abgegeben, lösliche Stoffe werden über die Nieren ausgeschieden.

Das Herz von Säugetieren ist hierzu aus vier Kammern aufgebaut. Das mit Sauerstoff (O_2) angereicherte Blut aus der Lunge strömt durch den linken Vorhof in den linken, muskulösen Ventrikel. Dieser pumpt das Blut durch die Aorta in den Körperkreislauf. Das mit CO_2 angereicherte Blut aus dem Körper fließt über die obere und untere Vena Cava in das rechte Atrium. Von hier gelangt das Blut in den weniger muskulösen rechten Ventrikel der es in den Lungenkreislauf pumpt, wo es CO_2 abgeben und O_2 aufnehmen kann (Abbildung 1).

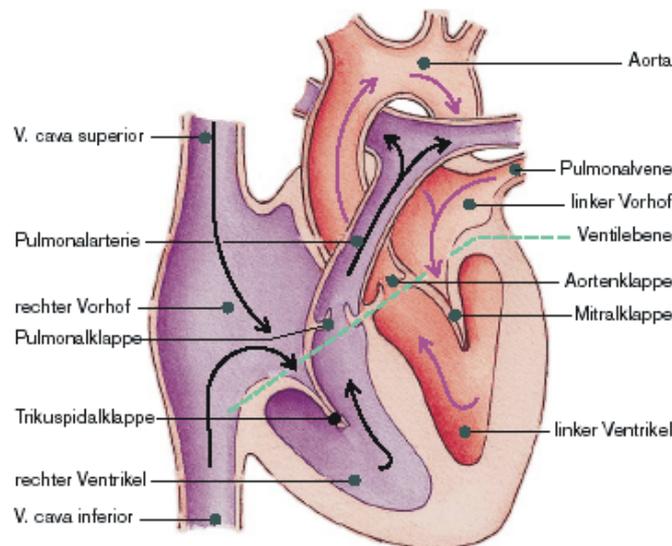


Abbildung 1: Das Säugetierherz, Erklärung siehe Text, [aus Klinke, Silbernagl; Lehrbuch der Physiologie, 2. Aufl. 1997 Thieme Verlag, Stuttgart]

Der Herzmuskel ist in drei Schichten aufgebaut. Das äußere Epikard besteht aus Epithelzellen und Bindegewebe. Das weitaus dickere Myokard besteht aus den sich kontrahierenden Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten). Sie sind durch Fusion mehrerer Vorläufer-Zellen entstanden und enthalten Muskelfibrillenbündel. Die Muskelfibrillen wiederum sind aus Sarkomeren aufgebaut, welche die Kontraktion des Muskels durch die Interaktion von Aktin und Myosin Filamenten vermitteln (Abbildung 2). Das Endokard besteht wieder aus Epithelzellen und Bindegewebe. Es kleidet das Herz von innen aus und sorgt so für einen geringen Widerstand des Blutstroms.

Das Herz ist in der Lage autonom zu arbeiten und seine Pumpleistung an die Anforderungen des Organismus anzupassen. Hierbei spielt der Frank-Starling Mechanismus eine entscheidende Rolle (Moss and Fitzsimons, 2002; Starling and Visscher, 1927). Kommt es zu einer Erhöhung des enddiastolischen Volumens (Volumen, bei dem der Ventrikel seine größte Ausdehnung besitzt) reagiert das Herz mit einer Steigerung der Kontraktionskraft, so dass sich das endsystolische Volumen (Volumen der maximalen Kontraktion des Ventrikels) nur geringfügig vom Ausgangswert unterscheidet. Eine Erhöhung des Volumens zieht also eine Erhöhung der Kontraktionskraft nach sich. Das Herz kann somit seine Kontraktionskraftentwicklung den gegebenen Anforderungen selbstständig angleichen. Die molekularen Grundlagen dieser Adaption, bei denen auch Titin eine Rolle spielen könnte, sind noch nicht im Detail verstanden, eine Übersicht findet sich bei Fukuda et al (Fukuda et al., 2001).

3.2 Das Sarkomer

Die kleinste kontraktile Einheit im Muskel ist das Sarkomer. Es besteht hauptsächlich aus den Proteinen Aktin (dünnes Filament) und Myosin (dickes Filament) welche für die Kontraktion verantwortlich sind.

Durch Änderung des Ca^{2+} Spiegels in der Zelle ändert sich die Konformation von Troponin, wodurch Tropomyosin im Aktinfilament verschoben wird. Dadurch werden Bindungsstellen im Aktinfilament freigegeben, mit denen nun Myosin interagieren kann. Durch Hydrolyse von ATP führt das Myosinköpfchen eine Ruderbewegung

durch, wobei das Aktinfilament zur M-Bande gezogen wird. Das Sarkomer kontrahiert (Abbildung 2).

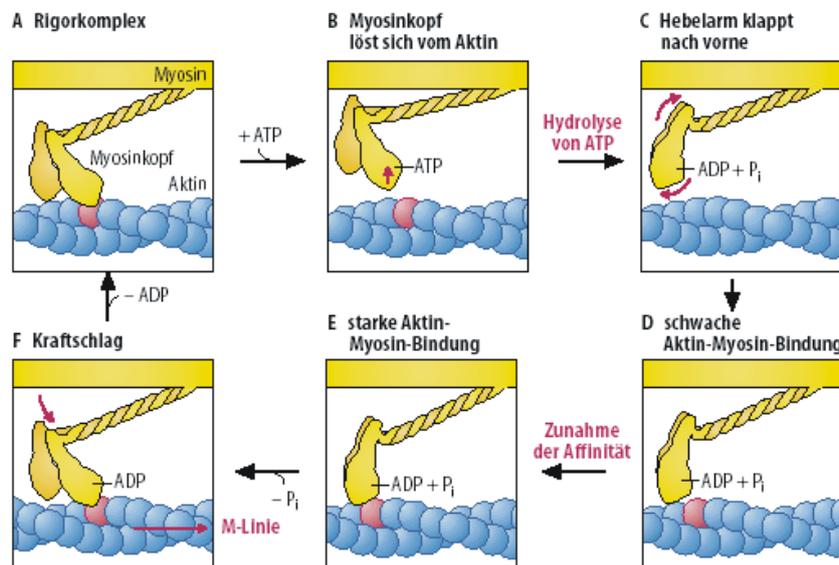


Abbildung 2: Kontraktion des Sarkomers durch Aktin und Myosin Interaktion A) Rigorkomplex, ohne ATP bleibt das Myosin im Anschluss an einen durchlaufenden Querbrückenzyklus fest an Aktin gebunden (Zustand der Totenstarre). B) Durch Bindung von ATP löst sich das Myosin vom Aktin. C) Durch Hydrolyse von ATP wird das Myosinköpfchen gespannt. D) Steigt die Ca²⁺ Konzentration in der Muskelzelle wird durch Interaktion von Ca²⁺ mit Troponin C das Tropomyosin tiefer in die Aktinfurche gezogen, Bindungsstellen für Myosin werden frei und das Myosinköpfchen bindet erst leicht, E) dann stärker an Aktin. F) Bei der Abdiffusion von Phosphat (P) und danach ADP kommt es zur Kippbewegung des Myosinköpfchen und damit zum Kraftschlag, das Aktinfilament wird hierbei zur M-Linie gezogen. Bis zur Bindung des nächsten ATP Moleküls bleibt das Myosinköpfchen am Aktin gebunden. [Aus Schmidt, Lang, Thews; Physiologie des Menschen; Springer Verlag 2005; Heidelberg]

Das dritthäufigste Muskelprotein ist Titin (Wang, 1984). Es formt sowohl im Herz- als auch im Skelettmuskel ein durchgehendes Filamentsystem (Abbildung 3). Neben Aktin und Myosin, die für die Kontraktion verantwortlich sind, finden sich im Sarkomer weitere Strukturproteine wie Nebulin und C-Protein, sowie Proteine des Stoffwechsels und der Signaltransduktion. Eine Übersicht über die Proteine des Sarkomers findet sich bei Clark et al.(Clark et al., 2002).

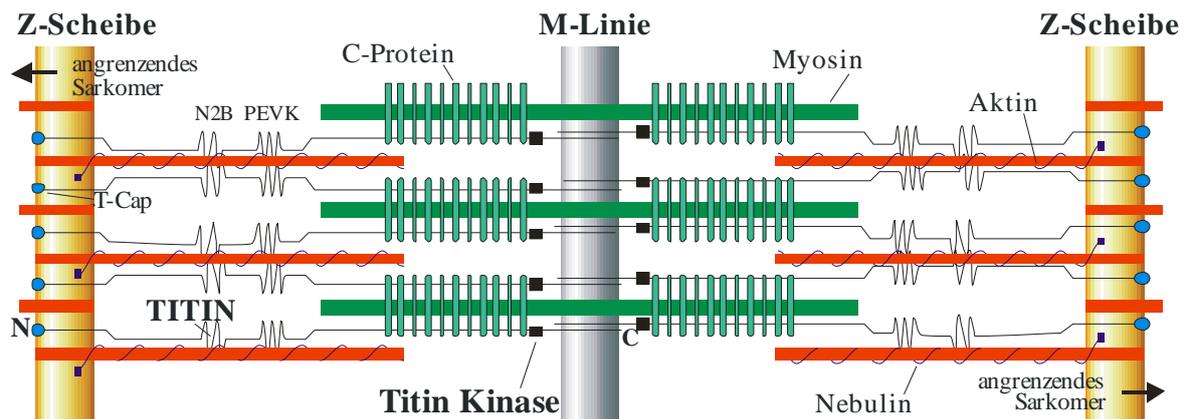


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Titin-Filamentsystems im Sarkomer des Herzmuskels. Das dünne Filament (Aktin, rot) ist in der Z-Scheibe (gelb) verankert, das dicke Filament (Myosin, grün) ist in der M-Linie (grau) integriert. Titin (schwarz) durchspannt das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie und bildet so ein durchgängiges Filamentsystem. T-Cap (blau) verbindet die Titinproteine in der Z-Scheibe. Nebulin bestimmt die Länge des Aktin-Filaments [modifiziert nach (Gregorio et al., 1999)]

3.3 Titin

3.3.1 Das Titin Filamentsystem

Das Titin Gen ist sowohl beim Menschen als auch bei der Maus auf Chromosom 2 lokalisiert (Labeit et al., 1990; Muller-Seitz et al., 1993; Rossi et al., 1994) und besteht beim Menschen aus 363 Exons (Abbildung 4). Durch alternatives Spleißen entstehen aus Transkripten von bis zu 100 kb Protein-Isoformen von 3.0–3.78 MDa (Freiburg et al., 2000; Labeit and Kolmerer, 1995).

Annähernd 90 % der Masse des Titin Proteins bilden Immunglobulin (IG) oder Fibronectin–Type 3 (FN3) Domänen (Linke et al., 1996). Innerhalb der A-Bande sind die IG und FN3 Domänen zu einem regelmäßigen „Superrepeat“-Muster arrangiert (Labeit and Kolmerer, 1995). Etwa 10 % der Masse bilden 17 unikale Sequenzabschnitte (Labeit et al., 1990; Labeit and Kolmerer, 1995). Sie kodieren zum Beispiel für Z-Scheiben Phosphorylierungsstellen, α -Aktinin Bindungsstellen, Calpain Protease Bindungsstellen, eine dehbare Region, die ausschließlich im Herzmuskeltitin vorkommt (N2B-Region), und ein M-Linien Phosphorylierungsmotiv (Ayooob et al., 2000; Gautel et al., 1993; Ohtsuka et al., 1997a; Ohtsuka et al., 1997b; Sebestyen et al., 1995; Sorimachi et al., 1997; Sorimachi et al., 1995; Turnacioglu et al., 1997; Young et al., 1998). Weiterhin enthält Titin eine Kinase Domäne, die mit

Mechanotransduktion und Sarkomerogenese assoziiert wurde (Mayans et al., 1998; Grater et al., 2005; Lange et al., 2005).

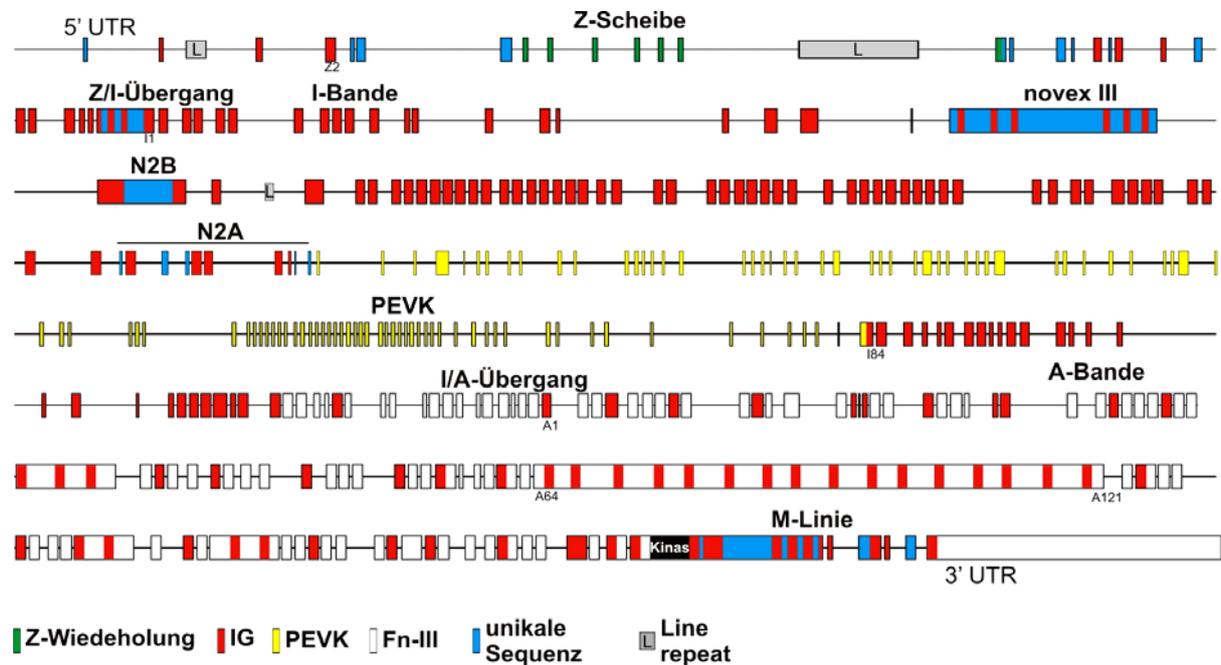


Abbildung 4: Die Exon Struktur des Titingens. Die unterschiedlichen Domänen sind farblich gekennzeichnet. Immunglobulindomänen (IG) sind rot, Fibronektin 3 Domänen weiß, die PEVK-Region gelb, die Z-Wiederholungen grün und die unikal Sequenzabschnitte blau dargestellt. Exon 49 enthält die N2B-Region und drei Immunglobulindomänen. [modifiziert nach (Bang et al., 2001a)].

Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass der N-Terminus von Titin die Z-Scheibe durchspannt und dort mit Telethonin (T-Cap) verbunden ist (Gregorio et al., 1998; Zou et al., 2006). Titin enthält im Bereich der I-Bande verschiedene elastische Federelemente, die für die Dehnbarkeit des Titinfilamentsystems verantwortlich sind (Granzier et al., 1996; Granzier et al., 1997; Helmes et al., 1999; Helmes et al., 1996; Linke et al., 1998a; Linke et al., 1999; Linke et al., 1998b). Durch unterschiedliches Spleißen der verschiedenen Federelemente variiert die Größe des Titin I-Banden Segments von ~800 kDa (Herzmuskelspezifische N2B Isoform) bis ~1.5 MDa (M. Soleus) (Freiburg et al., 2000); (Abbildung 5).

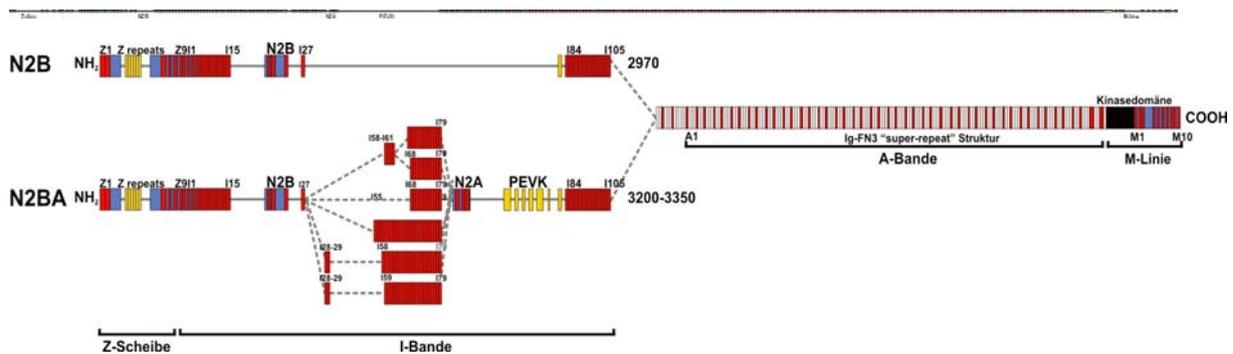


Abbildung 5: Isoformen von Titin. Dargestellt sind die beiden Herzspezifischen Isoformen N2B (oben) und N2BA (unten). Während für die N2BA Isoform einige Spleißisoformen von Titin existieren, ist für die N2B Isoform nur eine Spleißvariante bekannt. Es existieren weitere Spleißisoformen für die Skelettmuskulatur (nicht gezeigt). Die größte Variabilität findet sich in der I-Bande, während in der A-Bande die Exons nicht alternativ gespleißt werden (modifiziert nach (Freiburg et al., 2000)).

Über 2 MDa von Titin sind in der A-Bande lokalisiert, wo sie mit den dicken Filamenten durch multiple Bindungsstellen mit Myosin und C-Protein verbunden sind (Furst et al., 1992; Houmeida et al., 1995; Koretz et al., 1993; Linke et al., 1996). Titins C-Terminus integriert in die M-Linie und ist hier durch Myomesin verankert (Koretz et al., 1993; Obermann et al., 1996). Somit durchspannt Titin das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie und formt ein elastisches Filamentsystem, das sich über die gesamte Myofibrille erstreckt (Abbildung 3).

3.3.2 Titins elastische Elemente

Titins Dehnbarkeit beruht auf drei verschiedenen Sequenzelementen die in der I-Bande lokalisiert sind:

1. Den tandemartig arrangierten IG Domänen, welche sich 3 bis 4-fach bei geringer Kraft dehnen (Linke et al., 1996; Trombitas et al., 1998b). Die Entfaltung der IG Domänen findet jedoch erst bei unphysiologischer Dehnung statt (Linke and Granzier, 1998).
2. Dem herzspezifischen N2B Element, welches sich bei größerer Kraft dehnt (Helmes et al., 1999). Es dient als molekulare Feder (Watanabe et al., 2002). Die N2B-Region wird durch Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert und dadurch die passive Steifheit von Titin herabgesetzt. Dieses ermöglicht eine schnelle, vollständige Füllung des Ventrikels bei höherer Herzfrequenz durch β -adrenerge Stimulation (Yamasaki et al., 2002). Die mechanischen Eigenschaften der N2B-Region werden nicht direkt durch Ca^{2+} beeinflusst (Fujita et al., 2004).

Die N2B-Region ist nicht nur mechanisch aktiv, sie bindet zusätzlich das LIM Protein FHL2 als molekulare Plattform für metabolische Enzyme und modifiziert den Effekt β -adrenerger-Stimulation (Lange et al., 2002; Kong et al., 2001).

Auch α B-Crystallin, ein Chaperon, kann an die N2B-Region binden und die Elastizität von Titin verringern (Bullard et al., 2004). Auf die Rolle von Titins Bindungspartnern wird weiter unten genauer eingegangen.

3. Dem PEVK Segment, dem Hauptfeder-element des Skelettmuskels (Linke et al., 1998a). Im Herzen kommt nur eine verkürzte PEVK-Region vor. Sie ist in der N2BA Isoform um einige Exons länger als in der N2B Isoform. Die PEVK Exons der N2B Isoform (Exon 219 bis 225) sind in allen bekannten Titinisoformen enthalten. Dieser Bereich der PEVK-Region kann mit Aktin interagieren und so als „molekulare Bremse“ wirken (Kulke et al., 2001). Diese Interaktion kann durch S100A1/ Ca^{2+} negativ beeinflusst werden (Yamasaki et al., 2001). Somit könnte die Viskosität des Sarkomers kurz vor der Kontraktion, wenn der Ca^{2+} Spiegel in der Zelle steigt erniedrigt werden.

Die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften des Titin Filaments in unterschiedlichen Muskeln werden gewebespezifisch durch die Exon-Zusammensetzung der I-Bande bestimmt (Freiburg et al., 2000). Im Herzmuskel ist die passive Steifheit hauptsächlich von der unterschiedlich starken Expression der N2B und N2BA Isoformen abhängig (Trombitas et al., 2000b; Cazorla et al., 2000). Das Verhältnis von N2BA:N2B unterscheidet sich zwischen Spezies und zwischen linkem und rechtem Ventrikel (Cazorla et al., 2000; Neagoe et al., 2003). Im Laufe der Embryonalentwicklung und insbesondere nach der Geburt wird das N2BA:N2B Verhältnis zugunsten von N2B verschoben, so dass im adulten Herzen hauptsächlich das steifere N2B-Titin exprimiert wird (Warren et al., 2004; Opitz et al., 2004).

Entsprechend verändert sich postnatal die diastolische Wandspannung und damit die Füllung des Ventrikels. Die elastischen Eigenschaften beeinflussen zusätzlich die Kontraktion des Myokards über die Verkürzungsgeschwindigkeiten der Herzzellen.

Titin ist nicht der einzige Faktor, der die passive Steifheit des Muskels beeinflusst. Extrazelluläre Moleküle (z.B. Kollagen) tragen ebenfalls hierzu bei (Granzier and Irving, 1995; Wu et al., 2000). Bei einer Sarkomerlänge von 2,1 μm beruht die

passive Steifheit jedoch zu über 80 % auf Titin (Wu et al., 2000). Erst bei starker Dehnung, hin zum unphysiologischen Bereich, ist der Hauptteil der passiven Steifheit auf Kollagen zurückzuführen.

Die einzigartige Struktur und Anordnung von Titin im Sarkomer sowie seine elastischen und Signaldomänen machen es zu einem potentiellen Dehnungssensor. Die Expression von verschiedenen Titin Isoformen in unterschiedlichen Muskeltypen kann dabei die Sensoreigenschaften variieren und an die jeweiligen Erfordernisse anpassen, um letztlich abhängig von der Beanspruchung von Skelett- und Herzmuskel die Ausbildung von Muskelmasse zu regulieren. Bisher ist noch ungeklärt, wie die mechanische Belastung detektiert und in biochemische Signale umgewandelt wird. Eine mögliche Rolle spielen dabei die Interaktionspartner von Titin.

3.3.3 Titins Bindungspartner

Titin bindet sowohl strukturelle als auch Signal-Proteine (Abbildung 6). Wie schon erwähnt, ist Titin in der Z-Scheibe u.a. durch α -Aktinin und T-Cap und in der M-Linie durch Myomesin verankert. Im Bereich der A-Bande ist Titin über C-Protein mit Myosin verbunden. Die Dehnung von Titin findet daher hauptsächlich in der I-Bande statt. Um diese Dehnung der elastischen Bereiche von Titin zu detektieren und in Signale umzuwandeln, bedarf es Proteine, die an diese Regionen binden. Abbildung 6 zeigt Bereiche der I-Bande, für die Titin-Bindeproteine beschrieben sind.

Wie schon erwähnt, kann PKA die N2B-Region phosphorylieren und deren Spannkraft beeinflussen. Ebenfalls an die herzspezifische N2B-Region bindet das LIM Domänen Protein FHL2. Es besitzt mehrere Funktionen. Es beeinflusst den Stoffwechsel durch Bindung an Phosphofrukto-Kinase, Adenlyat-Kinase und Creatin-Kinase und hilft ATP dort zu synthetisieren, wo es während der Kontraktion verbraucht wurde (Lange et al., 2002). FHL2 kann zusätzlich in den MAPK Signalweg eingreifen, indem es mit ERK2 interagiert und dessen Transport in den Kern verhindert (Purcell et al., 2004). Der MAPK Signalweg ist an der Entstehung von Hypertrophie beteiligt (Braz et al., 2002). FHL2 kann letztendlich auch als Transkriptionsfaktor wirken und auch mit Spleißfaktoren interagieren (Du et al., 2002a; Johannessen et al., 2003; Morlon and Sassone-Corsi, 2003; Purcell et al.,

2004; Yan et al., 2003; Yang et al., 2005). Hierdurch kann FHL2 direkt Proteinexpression beeinflussen. Einen Einblick in die verschiedenen Funktionen und die Interaktionspartner von FHL2 bietet der Übersichtsartikel von Johannessen (Johannessen et al., 2006).

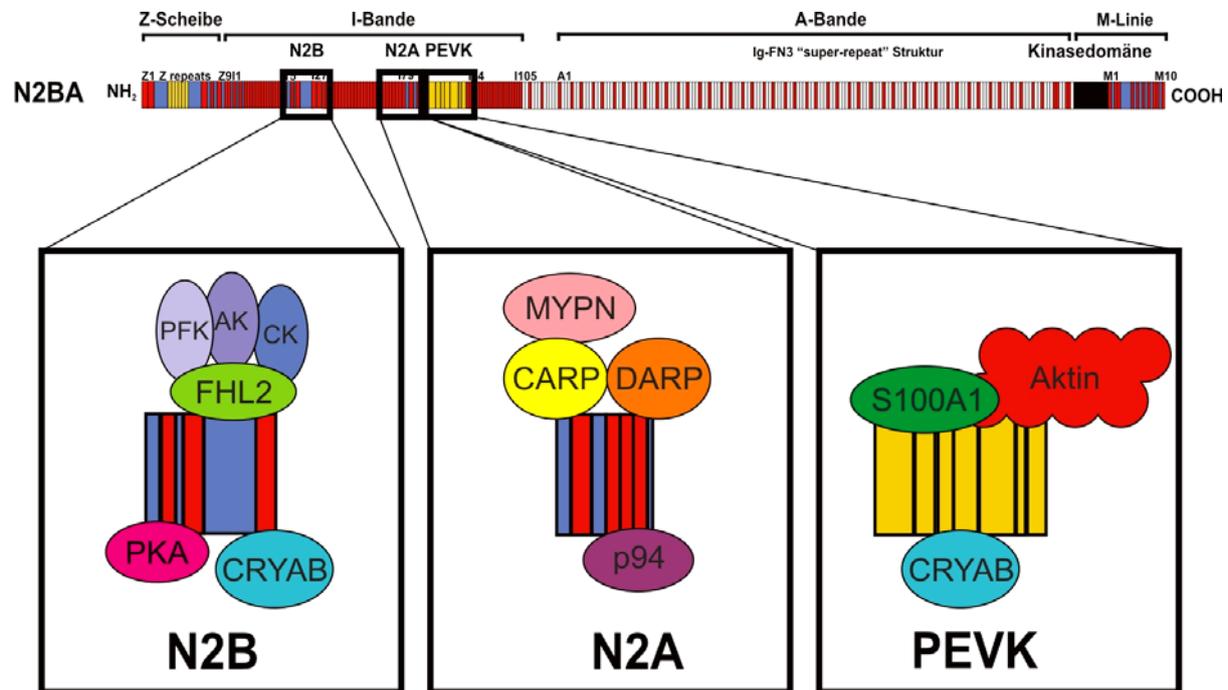


Abbildung 6: Proteininteraktion von Titin mit seinen Bindungspartnern in der I-Bande. An der N2B-Region binden α B-Crystallin (CRYAB) und FHL2, welches an der Signaltransduktion beteiligt ist. An FHL2 binden die metabolischen Enzyme Phosphofrukto-Kinase (PFK), Adenylat-Kinase (AK) und Creatin-Kinase (CK). An der N2A Region können Proteine der Stressantwort „Cardiac Ankyrin Repeat Protein“ (CARP) und „Diabetes related Ankyrin Repeat Protein“ (DARP) binden. Myopalladin (MYPD) bindet wiederum an CARP. Die PEVK-Region kann Aktin binden. Diese Interaktion wird durch S100A1 negativ beeinflusst. Auch α B-Crystallin bindet an die PEVK-Region.

Auch im Bereich der N2A Region binden Signalproteine. Zu Ihnen gehören die Muskel Ankyrin Repeat Proteine CARP und DARP. Sie werden nach Verletzung und Hypertrophie (CARP) oder bei Erholung nach Entkräftung (DARP) aktiviert bzw. stärker exprimiert (Miller et al., 2003; Zou et al., 1997). Beide Proteine können von der N2A Region zum Kern translozieren, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken. CARP interagiert mit Myopalladin - einem ~145 kDa Protein das ebenfalls im Sarkomer und im Kern lokalisiert ist. Myopalladin interagiert weiter mit α -Aktinin und spielt eine Rolle in der Bildung von „Stessfasern“ und der Z-Linie. Dieser CARP-

Myopalladin Komplex besitzt somit eine wichtige regulatorische Funktion für den Erhalt der Sarkomer-Struktur (Bang et al., 2001b).

Ebenfalls in der N2A Region (IG 82/83), bindet p94 alias Calpain-3, eine Protease, die am Abbau von Titin beteiligt und auch für die Erhaltung der Sarkomerstruktur verantwortlich ist (Kramerova et al., 2004).

Wie schon erwähnt bindet S100A1 an die PEVK-Region und kann hierdurch, Ca^{2+} abhängig, die Interaktion mit Actin verhindern (Kulke et al., 2001; Yamasaki et al., 2001).

Ein universaler Bindungspartner für die N2B-Region, PEVK-Region und die IG Domänen ist α B-Crystallin, ein Mitglied der Familie der kleinen Hitzeschockproteine, die als Chaperone wirken und für die richtige Faltung der Proteine sorgt. Da diese Regionen bei Dehnung entfaltet werden, ist eine korrekte Rückfaltung für den Erhalt der elastischen Funktion wichtig. Bei Ischämie ist α B-Crystallin hochreguliert und schützt möglicherweise Titin vor strukturellem Schaden bei erhöhter Belastung.

Weiterhin kann α B-Crystallin $PKC\alpha$ beeinflussen und in den RAF/MEK/ERK Signalweg eingreifen (Liu et al., 2004), der auch an der Entwicklung von Hypertrophie beteiligt ist (Braz et al., 2002).

Die Dehnung und Rückfaltung der elastischen Domänen Titins bewirkt eine veränderte Konformation und ermöglicht damit eine Dehnungsabhängige Proteininteraktion. Durch die genannten Bindungsproteine beeinflusst Titin transkriptionale Aktivität, und ist damit in der Lage als Mechanosensor zu wirken.

3.3.4 Titin bei Herzkrankheiten

Titin spielt auch eine Rolle bei der Entstehung von Herzkrankheiten. So konnten verschiedene Mutationen im Titingen nachgewiesen werden, die zu der Entwicklung von dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und hypertropher Kardiomyopathie (HCM) beitragen. Satoh und Mitarbeiter zeigten so, dass eine Mutation von Titin in einem Z-Scheiben-Exon, welches für die Bindung von Actinin verantwortlich ist, zur Entwicklung von Hypertrophie führt (Satoh et al., 1999). Gerull und Mitarbeiter fanden Mutationen im C-terminalen Bereich von Titin, welche zur Ausprägung einer DCM führten (Gerull et al., 2002). Eine weitere Mutation am Titin N-Terminus im Bereich der Z-Scheibe führt zur DCM. Hierbei wird die Interaktion von Titin mit T-Cap gestört (Itoh-Satoh et al., 2002). Schließlich wurden auch Mutationen in der N2B-

Region beschrieben, die zur Entstehung von DCM oder HCM beitragen (Itoh-Satoh et al., 2002; Matsumoto et al., 2006). Eine Mutation in der N2B-Region führt zu einem verkürzten Titin wodurch eine DCM entsteht, eine zweite Mutation in der N2B-Region (Ser3799Tyr) führt zu erhöhter Bindung von FHL2 im Yeast-2-Hybrid Screen. Patienten mit dieser Mutation wiesen eine Hypertrophie des Herzens auf. Im Zebrafisch bewirkt eine Stop-Mutation in der N2B-Region gestörten Sarkomeraufbau bei dünneren nur schwach kontraktile Kardiomyozyten (Xu et al., 2002). Dieser Phänotyp ist möglicherweise auf das Fehlen der M-Linie zurückzuführen (Weinert et al., 2006).

Herzerkrankungen führen zu Veränderungen im Verhältnis von Titin N2BA:N2B. So ist bei DCM Patienten und bei Patienten mit Herzkranzgefäßerkrankungen (CAD) das N2BA:N2B zur schlafferen N2BA Isoform verschoben (Makarenko et al., 2004; Nagueh et al., 2004; Neagoe et al., 2002). Bei verstärkter Expression des längeren N2BA Titin sind auch die N2A Bindungspartner CARP, DARP und Ankrd-2 hochreguliert (Nagueh et al., 2004). Im Gegensatz hierzu wird im Rattenmodell mit Bluthochdruck das Titin Isoformenverhältnis zu Gunsten des steiferen, kürzeren N2B Titins verschoben (Warren et al., 2003a).

Im Vergleich zur Ratte entspricht die Expression von Titin Isoformen in der Maus besser der des Menschen. Die Ratte besitzt eine zusätzliche N2BA Isoform, insgesamt jedoch weniger N2BA als Maus oder Mensch (Neagoe et al., 2003). Die Maus ist zudem als Tiermodell geeignet, da man, im Gegensatz zur Ratte, Knockout-Mauslinien herstellen und so die Funktion verschiedener Bereiche von Titin durch Deletion untersuchen kann.

3.4 Knockout Technologie

Grundlage der Knockout (KO) Technologie ist die Verwendung von embryonalen Stammzelllinien (ES-Zellen) wie sie erstmals in den 80er Jahren von Evans und Kaufmann beschrieben wurden (Evans and Kaufman, 1981). Um eine Ausdifferenzierung dieser totipotenten Zellen in der Zellkultur zu hemmen und das Wachstum zu verbessern, werden diese auf mitotisch inaktivierten primären embryonalen Fibroblasten (Feederzellen) kultiviert. Zusätzlich wird dem Medium LIF (Leucocyte Inhibitory Factor) zugegeben, ein Proteinfaktor, der die Ausdifferenzierung der ES-Zellen inhibiert (Smith et al., 1988).

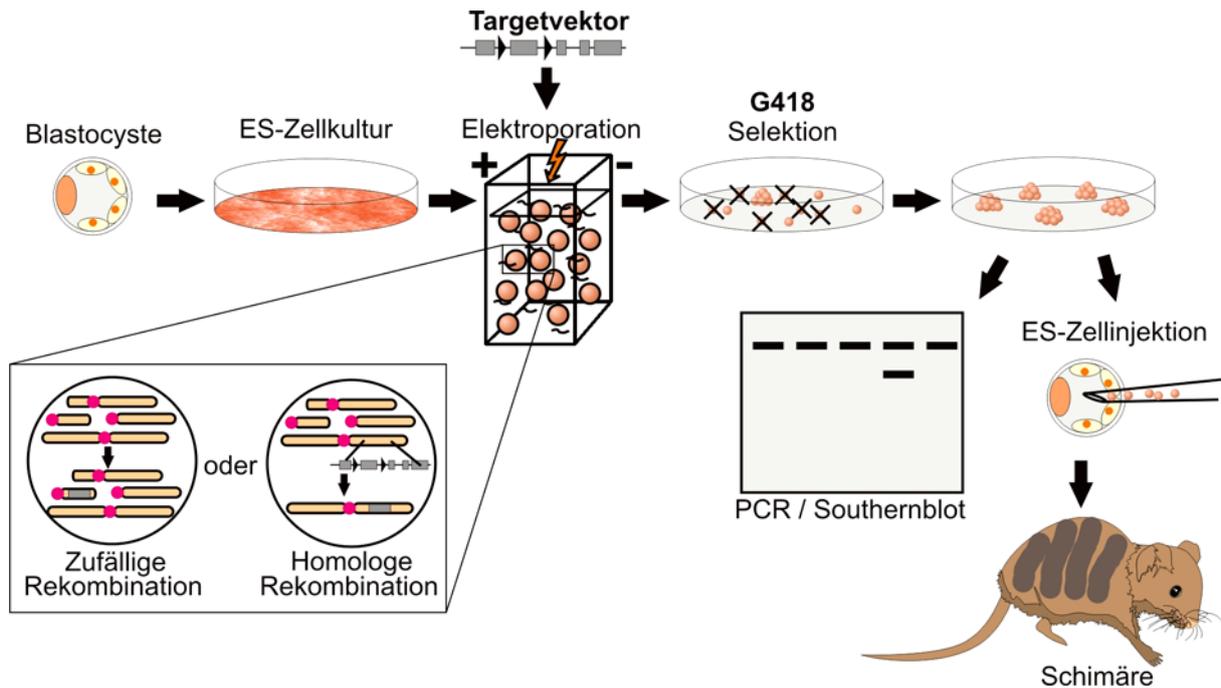


Abbildung 7: KO Technologie. Aus Blastozysten werden ES-Zellen gewonnen. Diese können für ein Targetingexperiment eingesetzt werden. Nach der Elektroporation kommt es zu zufälligen und homologen Rekombinationen des Targeting-Vektors in den ES-Zellen. Durch Selektion überleben nur ES-Zellen, die das Targetingkonstrukt stabil ins Genom integriert haben. Nach Überprüfung der ES-Zellen auf homologe Rekombination, werden diese in Blastozysten injiziert. Aus diesen Blastozysten entstehen Tiere, welche das Targetingkonstrukt stabil an der gewünschten Position im Genom integriert haben.

Durch Elektroporation kann rekombinante DNA in die ES-Zellen eingebracht werden. Hierbei öffnet ein kurzer Stromimpuls kurzzeitig die Zellmembran, so dass die DNA in die Zelle eintreten kann (Piedrahita et al., 1992; Austin et al., 2004). Bei einer geringen Anzahl der Zellen integriert die DNA hierbei stabil ins Genom.

Eingebrachte DNA, die große Sequenzhomologien zur genomischen DNA aufweist, kann im Gegensatz zur zufälligen Integration auch durch homologe Rekombination integriert werden (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987).

DNA, welche durch molekularbiologische Techniken *in vitro* zum Zweck der homologen Rekombination hergestellt wurde, wird als Targeting-Vektor bezeichnet.

Um auf das seltene Ereignis der Integration selektieren zu können, wird in den Targeting-Vektor eine Neomycinresistenzkassette eingebaut. Sie enthält neben einem ubiquitären Promoter das Bakterielle Gen für die Neomycinphosphotransferase. Dieses Enzym kann G418 abbauen, welches die Translation in Säugerzellen inhibiert. Nur Zellen, die den Targetingvektor stabil in ihr

Genom integriert haben, sind gegen G418 resistent und können in Gegenwart dieses Antibiotikums wachsen.

Resistente Zellen werden durch PCR und Southernblot auf homologe Rekombination hin untersucht (Abbildung 7) (Piedrahita et al., 1992; Austin et al., 2004). Die homolog rekombinierten ES-Zellen werden in Blastozysten injiziert und diese in den Uterus von Ammenmüttern implantiert, wo sie sich zu schimären Tieren aus beiden Zellpopulationen entwickeln. Um diese beiden Zellpopulationen unterscheiden zu können, werden die ES-Zellen von einer Mauslinie mit heller, agouti Fellfarbe (129J), die Blastozysten von einer Mauslinie mit schwarzer Fellfarbe (C57BL/6) verwendet. Schimäre Tiere können dann an ihrer gefleckten Fellfarbe erkannt werden (Bradley et al., 1984). Entwickeln sich aus den veränderten ES-Zellen auch Keimbahnzellen, so kann das veränderte Gen an die Nachkommen weitergegeben werden.

Da die Neomycinresistenzkassette den Phänotyp beeinflussen kann (Kaul et al., 2000), werden die heterozygoten Tiere welche die Neomycinresistenzkassette tragen, mit sogenannten FLP-Deleter-Mäusen verpaart und dadurch die Neomycinresistenzkassette zwischen den beiden Frt-Sequenzelementen entfernt (Rodriguez et al., 2000).

Das FLP-Frt System ist homolog zum CRE-lox System aus Bakteriophagen. Beide Rekobinasen erkennen eine kurze, gerichtete DNA Sequenz und ermöglichen das Ausschneiden der Sequenz zwischen zwei Frt- bzw. lox-Sequenzen.

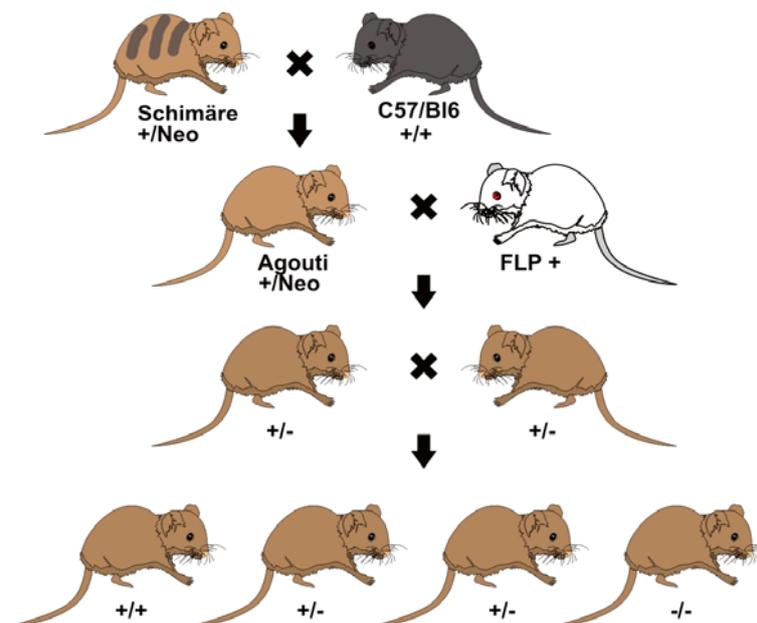


Abbildung 8: Kreuzungsschema der Versuchstiere (Erklärung siehe Text)

Durch Verpaarung der heterozygoten, Neomycinresistenzfreien Nachkommen untereinander werden homozygote Tiere generiert, die nur noch das veränderte Gen und ein F_{rt}-Sequenzelement besitzen. Diese Tiere werden für die Untersuchung der Deletion verwendet. Weiterhin entstehen heterozygote Tiere, die für weitere Verpaarung genutzt werden können und wildtyp Tiere welche als Kontrollen dienen (Abbildung 8).

3.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die elastischen Eigenschaften von Titin, sowie die Auswirkungen des Verlustes der elastischen N2B bzw. PEVK Domänen auf das Herz und seiner Zellen zu untersuchen. Hierzu werden N2B- bzw. PEVK-defiziente Tiere generiert und sowohl molekular als auch physiologisch untersucht.

Arbeitshypothesen:

Die N2B-Region ist für die diastolische Funktion des Herzens unerlässlich.

Das elastische N2B Element von Titin ist in Vertebraten konserviert. Entsprechend sollte es eine wichtige Funktion im Herzmuskel übernehmen.

Zu Beginn meiner Arbeit war nur eine Mutation in Titins N2B-Region bekannt, die einem Aminosäureaustausch zur Folge hat. Diese führt heterozygot zur dilatativen Kardiomyopathie (Itoh-Satoh et al., 2002). Überexpression der löslichen N2B-Region in Zellkultur oder Stop-Mutation im Zebrafisch N2B führen zur Auflösung der Struktur des Sarkomers (Linke et al., 1999; Xu et al., 2002). Eine Deletion der N2B-Region und daraus folgende Expression von steiferem Titin sollte zur Entstehung von Herzerkrankungen oder sogar zu Entwicklungsstörungen des Herzens führen.

Die N2B-Region moduliert die elastischen Eigenschaften des Herzmuskels.

Durch die Deletion der N2B-Region sollten sich die elastischen Eigenschaften von Titin und damit des Herzmuskels ändern. Dies sollte an Kardiomyozyten, an Muskelfasern und auch an der diastolischen Funktion des Herzens in der Echokardiographie nachzuweisen sein.

Da die N2B-Region nach adrenerger Stimulation über PKA phosphoryliert wird und hierdurch eine höhere Elastizität erreicht werden kann, sollte der N2B Knockout auch unter adrenerger Stimulation eine erhöhte Steifheit aufzeigen.

Die Deletion der N2B-Region sollte zur Mislokalisierung des Bindungspartners FHL2 führen.

Die Deletion der N2B-Region sollte zum Verlust der Bindung von FHL2 im I-Banden Bereich von Titin führen. Hierdurch wäre eine Störung des Stoffwechsels der Kardiomyozyten denkbar. Weiterhin kann eine Änderung der Hypertrophie-Signaltransduktion und damit des Herz-Wachstums erwartet werden, da FHL2 direkt Transkription und MAPK-Signaltransduktion beeinflusst.

Die PEVK-Region wirkt als „Molekulare Bremse“.

Die Deletion der herzspezifischen PEVK Exons führt zu Veränderung der Elastizität des Titinproteins. Hierdurch wird die Herzfunktion beeinträchtigt und es sollte zur Entstehung von Herzkrankheiten oder sogar zu Störungen während der Entwicklung des Herzens kommen.

Mit Generierung dieser beiden Mausmodelle, welche die elastischen Eigenschaften von Titin und damit des Sarkomers beeinflussen, soll ein Einblick in die diastolische Funktion des Herzens und damit in die Entstehung von Herzerkrankungen ermöglicht werden.