

## 6 Diskussion

Die elastischen Eigenschaften der N2B Region als auch der PEVK Region wurden *in vitro* durch „Atomic-Force“- Experimente beschrieben (Watanabe et al., 2002; Leake et al., 2006).

Ziel dieser Arbeit war es die mechanischen Eigenschaften der N2B Region bzw. der PEVK Region *in vivo* zu untersuchen. Weiterhin war zu klären, welche Rolle diese Regionen in der Signaltransduktion spielen und ob sich die Deletionen auf die Lokalisation und Expression der Titin-Bindungspartner FHL2 und  $\alpha$ B-Crystallin (N2B) sowie S100A1 (PEVK) auswirken.

Dazu sollten Knockout-Mäuse erzeugt werden, denen die N2B bzw. die PEVK Region fehlt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber einem Knockdown Ansatz durch RNA Interferenz (RNAi) ist, dass die Deletion vollständig ist. Im homozygoten Knockout ist somit kein Wildtypprotein mehr vorhanden, welches den Phänotyp beeinflussen kann. Weitere Nachteile der Knockdown-Technik sind, dass Sie nicht effektiv außerhalb des Zellkultur-Systems angewendet werden kann, dass die Wirkung von RNAi nur von relativ kurzer Dauer ist, und dass die selektive Entfernung mehrerer Exons nahezu unmöglich ist. Des Weiteren wird ein effektiver Gentransfer benötigt, z.B. durch Virale Vektoren, welche ebenfalls den Phänotyp beeinflussen können. Die Kombination der langen Titin-Halbwertszeit von ca. 3 Tagen (Isaacs et al., 1989) mit der Tatsache, dass primäre murine Kardiomyozyten nur eine relativ kurze Lebensdauer (1 Woche) in der Zellkultur aufweisen, zeigt, dass die Knockout-Technologie für die angestrebten Analysen besser geeignet ist.

Durch die Deletion der beiden elastischen Titin Regionen N2B und PEVK wurden mit dieser Arbeit zwei neue Tiermodelle für die weitere Erforschung der Herzmuskelfunktion etabliert.

### 6.1 Generierung der N2B- und PEVK-Knockout-Modelle

Im N2B Knockout wurde das Exon 49, im PEVK Knockout die Exons 219 bis 225 deletiert, indem sie durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt wurden. Die Neomycinresistenzkassette konnte, da sie von FRT-Schnittstellen flankiert war, nach erfolgreicher Rekombination der Targetvektoren in ES-Zellen und deren Selektion, ausgeschnitten werden. Hierdurch konnte die Neomycinresistenzkassette nicht mehr den Phänotyp beeinflussen, wie u.a. von Kaul und Mitarbeitern beschrieben (Kaul et

al., 2000). Zurück blieb eine FRT-Schnittstelle in der Intron-Sequenz. In den Targetingstrategien wurde darauf geachtet, dass die Sequenz der Exons nicht verändert und hierdurch der Leseramen von Titin nicht beeinträchtigt wurde.

Die Rekombinationseffizienz lag bei den N2B Targetings bei 1:360 und bei den PEVK Targetings bei 1:480. Dung und Cappecchie erzielten zum Vergleich bei einem >10 kb Targeting-Konstrukt eine Rekombinationseffizienz von  $10^{-4}$  (Deng and Capecchi, 1992). Die Effizienz der homologen Rekombination hängt sehr stark von der Homologie der Sequenz des Targeting-Vektors und des Genoms der verwendeten ES-Zellen ab. So berichten Udy und Mitarbeiter von Schwankungen in der Effizienz von 1:189 in R1 Zellen bis 1:1561 in E14 Zellen mit gleichem Konstrukt (Udy et al., 1997). Die Rekombinationseffizienz der N2B und PEVK Targeting-Vektoren entspricht daher Werten aus der Literatur.

Nach homologer Rekombination konnten somit für N2B zwei unabhängige für PEVK eine ES-Zelllinie etabliert werden. Alle drei ES-Zelllinien waren in der Lage zu Keimbahnzellen zu differenzieren. Aus ihnen ging je eine mutante Mauslinie hervor, die für die weiteren Analysen zur Verfügung stand.

## **6.2 Der Aufbau der Sarkomere in N2B- und PEVK-defizienten Tieren ist nicht beeinträchtigt.**

Weder die PEVK-, noch die N2B-defizienten Mauslinien sind in ihrer Embryonalentwicklung oder Lebenserwartung eingeschränkt.

Damit ist die N2B Region nicht, wie es von Linke und Mitarbeitern (Linke et al., 1999) postuliert, für den Erhalt der Integrität des dünnen Filaments notwendig. Die Auflösung des Aktin Filamentsystems nach Transfektion des N-terminalen Bereiches der N2B Region in Zellkulturexperimenten ist damit ein sekundärer Effekt und nicht auf die Funktion der N2B Region zurückzuführen. Auch Xu und Mitarbeiter (Xu et al., 2002) fanden eine Störung in der Sarkomerogenese des Zebrafisches, sowohl in der natürlichen Mutante (*pick<sup>m117</sup>*), die ein Stopkodon in der N2B Region enthält, als auch im Knockdown-Experiment der N2B Region. Sowohl bei Überexpression als auch bei Verlust der N2B Region sollte demnach die Ausbildung der Sarkomere und die Entwicklung des Organismus gestört sein. Dieses konnte ich durch meine Experimente widerlegen. Weder die N2B- noch die PEVK-Region werden für die Sarkomerogenese und Erhalt der Sarkomer-Struktur benötigt. Der von Xu beobachtete Phänotyp könnte daher auf ein verkürztes Titin zurückzuführen sein,

das nicht mehr in der M-Linie integriert, so dass die Struktur des Sarkomers unter Belastung nicht mehr erhalten wird. Dieser Pathomechanismus ist von Weinert und Mitarbeitern für den Titin M-Line Exon1-2 Knockout beschrieben. Die Deletion dieser beiden Exons interferiert nicht mit dem Aufbau des Sarkomers, das sich jedoch unter Belastung auflöst und damit zum Tod der Mausembryonen am Tag E11.5 führt (Weinert et al., 2006). Im Gegensatz zur Titin-I-Bande hat die M-Bande damit eine wichtige strukturelle Funktion in der Stabilisierung des Sarkomers.

Die Gel-Analyse des Titin Proteins zeigte eindeutig ein verkürztes Produkt in N2B-defizienten Herzen. Die Deletion allein der N2B Region konnte im Westernblot bestätigt werden. Histologische, Immunhistologische und auch immunelektronenmikroskopische Studien zeigten, dass der Aufbau des Herzens bis hinunter zum Sarkomer nicht gestört ist.

Die PEVK-Knockout-Tiere exprimieren ein um 281 Aminosäuren verkürztes Titin Protein, welches sich jedoch nicht von der Wildtyp-Isoform im Agarosegel trennen lässt. Dass ausschließlich die Exons 219 bis 225 in dem Titintranskript fehlen, konnte auf mRNA Ebene durch eine Titin-Exon-Chipanalyse bestätigt werden. Und durch Antikörperfärbungen gegen die N2B-Region und gegen die M-Banden-Region von Titin konnte gezeigt werden, dass das PEVK-defiziente Titin nicht in seiner Lokalisation im Sarkomer gestört ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die N2B Region, als auch die im Herzen exprimierte PEVK Region nicht für die Sarkomerogenese, den Erhalt der Struktur des Sarkomers und die Herzfunktion essentiell sind.

### **6.3 Erhöhte passive Steifheit und diastolische Dysfunktion in N2B- und PEVK-defizienten Tieren**

Sowohl in der echokardiographischen Analyse, als auch durch direkte Messung der Herzgewichte zeigte sich, dass die Herzen der N2B-defizienten Tiere kleiner als die Herzen von vergleichbaren Wildtyp-Tieren sind. Dies spiegelt sich in einem reduziertem Ventrikelgewicht / Körpergewicht Verhältnis (Vw/Bw) wieder. Während die Wildtypen aus einem gemischten 129/C57BL/6 Hintergrund ein Vw/Bw von 4,4 mg/g besitzen, welches zwischen dem der Mausstämme C57BL/6 (4,22 mg/g) und 129S1/SvImJ (4,72 mg/g) liegt, weisen die N2B-defizienten, aber auch die heterozygoten Tiere ein geringeres Vw/Bw Verhältnis von nur 3,9 bzw. 3,8 mg/g auf. Dieses ist geringer als alle verfügbaren Messwerte für das Herzgewicht /

Körpergewicht Verhältnis der Jackson Laboratory Datenbank ([www.jax.org](http://www.jax.org)). Das bedeutet, dass schon der Verlust der N2B Region auf einem Allel Auswirkungen auf die Entwicklung der Ventrikelgröße hat. Ob dieses direkt über die erhöhte Steifheit von Titin oder indirekt über den Einfluss von Bindungspartnern von Titin zustande kommt, bleibt zu klären. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass der Knockout des N2B Bindungspartners FHL2 ein geringeres Herzgewicht /Körpergewicht Verhältnis zeigt (Kong et al., 2001), aber auch die erhöhte Expression von ANP einen negativen Einfluss auf das Ventrikelgewicht hat (Barbee et al., 1994).

Im Gegensatz zum N2B Knockout ist das Ventrikelgewicht / Körpergewicht Verhältnis im PEVK Knockout nicht gestört. Dies deutet darauf hin, dass das Herz-Wachstum entweder von der Größe der Deletion abhängt, oder dass spezifisch die N2B Region oder deren Bindungspartner (z.B. FHL2) die Herz-Größe beeinflussen.

Die erhöhte Steifheit, welche aus dem Verlust der elastischen N2B Region resultiert, wird vom Organismus teilweise durch erhöhte Expression der schlafferen N2BA Isoform ausgeglichen. Das Isoformenverhältnis von N2B zu N2BA wird, wenn auch nur leicht, zu Gunsten des weicheren N2BA verschoben.

Bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung oder dilatativer Kardiomyopathie kann wie auch im N2B Knockout eine Verschiebung der Isoformen beobachtet werden (Makarenko et al., 2004; Nagueh et al., 2004; Neagoe et al., 2002). Auch hier wird die steifere N2B-Titin-Isoform teilweise durch die weichere N2BA-Isoform ersetzt. Die veränderte Expression von Titin-Isoformen und damit veränderte Elastizität ist hier nicht die Ursache der Herzerkrankung, sondern ein sekundärer Effekt.

Dass das N2B-defiziente Titin steifer ist, wurde durch Messungen an isolierten Muskelfasern gezeigt. Diese Veränderung beeinflusst die Herzfunktion, wie durch Echokardiographie und Messungen am isolierten N2B-defizienten Herzen bestätigt wurde. Im isoliert-arbeitenden N2B-defizienten Herzen zeigte sich ein erhöhter passiver Wandstress, der auf die erhöhte Steifheit des Ventrikels, bzw. der Muskelfasern zurückzuführen ist.

Auch in der Echokardiographie konnte eine erhöhte Steifheit des Ventrikels festgestellt werden. Sie zeigte sich durch erhöhtes E/A Verhältnis und eine Veränderung der diastolischen Funktion speziell in der Dezelerationszeit des Blutflusses, gemessen an der Mitralklappe. Beides sind Anzeichen für eine restriktive

Füllung des Ventrikels, wie sie bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zu beobachten ist (Vitarelli and Gheorghide, 1998). Weiterhin konnte bei den N2B-defizienten Tieren eine erhöhte prozentuale Verkürzung (fraktional shortening) festgestellt werden. Dadurch kann das geringere Ventrikelvolumen ausgeglichen werden. Das Schlagvolumen des N2B Knockouts wird dem des Wildtyps angeglichen.

Durch die immun-elektronenmikroskopischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass im N2B-Knockout verstärkt die PEVK-Region und die proximalen IG-Domänen gedehnt werden. Die geringe Größe der PEVK-Region in der Herz-spezifischen N2B-Isoform und die weniger elastischen IG-Domänen könnten die Grundlage der erhöhten Steifheit des N2B-Knockout-Herzens sein.

Die Untersuchung der PEVK-defizienten Tiere in der Echokardiographie ergab, dass in den Herzen ein Trend zur geringeren prozentualen Verkürzung besteht, sie kontrahieren also im Vergleich zum Wildtyp weniger stark. Dies wird durch eine erhöhte Herzrate teilweise kompensiert.

Somit konnte gezeigt werden, dass das steifere N2B-defiziente und das PEVK-defiziente Titin eine diastolische Funktions-Störung verursacht, die sich jedoch bei beiden Knockouts unterschiedlich manifestiert. Während der N2B Knockout durch erhöhtes „fraktional shortening“ die Pumpleistung des Wildtyps erreicht, wird im PEVK Knockout das verminderte „fraktional shortening“ durch eine erhöhte Herzfrequenz kompensiert.

#### **6.4 Die kontraktile Funktion ist in N2B defizienten Kardiomyozyten erniedrigt, in PEVK defizienten Zellen erhöht**

Die mechanischen Eigenschaften Titins bestimmen nicht nur die elastische Funktion des Sarkomers, es beeinflusst damit auch die Pumpfunktion. Einerseits könnte Titin als Stossdämpfer während der Kontraktion wirken, andererseits ist Titin nach der Kontraktion für die Rückführung des Sarkomers auf seine Ruhelänge verantwortlich (Granzier and Labeit, 2004). Diese These wird durch die vorliegende Arbeit unterstützt, da im N2B Knockout eine verkürzte Sarkomerruhelänge gemessen wurde.

Die erhöhte prozentuale Verkürzung, im N2B Knockout, welche in der Echokardiographie zu beobachten war, führt aber nicht zu erhöhtem systolischem Druck, wie die Untersuchung im isoliert arbeitenden Herzen ergab. Auch an isolierten

Muskelfasern konnte beim N2B Knockout keine erhöhte aktive Kraft gemessen werden. Die systolische Funktion ist im unstimulierten N2B-Knockout nicht verändert. Der Frank-Starling-Mechanismus wird somit unter unstimulierten Bedingungen durch die erhöhte Steifheit des N2B-defizienten Ventrikels nicht beeinflusst.

Isolierte Herzmuskelzellen kontrahieren ohne Belastung aus der Ruhelänge heraus und werden daher nicht vom Frank-Starling Mechanismus beeinflusst. Die Kontraktilität der vermessenen Wildtyp Zellen und auch die der N2B heterozygot defizienten Zellen entspricht Literatur-Daten (Song et al., 2003). Durch Entfernen der N2B Region, zeigte sich eine geringere Kontraktilität der homozygot defizienten Zellen. Sie weisen eine geringere prozentuale Verkürzung und geringere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten als der Wildtyp auf. Ursache dafür könnte die erhöhte Steifheit sein, die hier nicht durch weitere Effekte wie hormonale Regulation beeinflusst wird. Da die heterozygoten N2B Knockout-Tiere anders als der PEVK-Knockout keinen intermediären Phänotyp zeigen, ist dies jedoch unwahrscheinlich. Es wäre daher möglich, dass die geringere Kontraktilität auf ein Stoffwechselproblem zurückzuführen ist. Die Proteinmenge von FHL2 ist im N2B Knockout herunterreguliert und FHL2 dient unter anderem als Plattform für Metabolische Enzyme (Lange et al., 2002). Daher wäre es denkbar, dass FHL2 diese Aufgabe nicht mehr zu genüge erfüllen kann und es somit zu einer Energie (ATP)-Unterversorgung im Sarkomer, mit reduzierter Kontraktilität der Zellen, kommt. Weiterhin würden die Zellen nicht so ausdauernd wie die Wildtypzellen kontrahieren, da Ihre Energiereserven schneller erschöpft sind. In der Tat konnte dies bei der Präparation und Messung der Kardiomyozyten beobachtet werden. Nach Zugabe von Isoproterenol stieg jedoch die Zahl der kontrahierenden Zellen dramatisch an. Dies würde einerseits bedeuten, dass diese Zellen funktionsfähig waren, andererseits aber auch, dass durch adrenerge Stimulation weitere Energiereserven mobilisiert werden können. Daten hierzu wurden jedoch nicht erhoben.

In isolierten PEVK-Knockout Kardiomyozyten ist die Kontraktilität erhöht. Losgelöst aus dem Gewebeverbund zeigen diese Zellen eine erhöhte prozentuale Verkürzung. Diese erhöhte Kontraktilität der Zellen war erwartet, da die herzspezifische PEVK Region durch Interaktion mit Aktin als „molekulare Bremse“ fungieren kann (Yamasaki et al., 2001; Kulke et al., 2001). Diese Interaktion wird  $Ca^{2+}$ -abhängig durch S100A1 negativ reguliert (Yamasaki et al., 2001). Der S100A1 Knockout zeigt unter Belastung geringere Kontraktilität des Herzens (Du et al., 2002b), während bei

adenoviraler Überexpression von S100A1 in Zellkulturexperimenten eine erhöhte Kontraktilität festgestellt werden konnte (Most et al., 2004). Beides ist gut mit der These der „molekularen Bremse“ durch PEVK-Aktin-Interaktion und mit der Regulation durch S100A1 vereinbar. Somit kann die PEVK-Region an Aktin binden und hierdurch die Steifheit und die Kontraktilität des Muskels beeinflussen. Nach  $\text{Ca}^{2+}$  Ausschüttung, also während bzw. kurz vor der Kontraktion, bindet S100A1 an die PEVK-Region und verhindert hierdurch die Interaktion mit Aktin. Dadurch, dass die Bindung von Aktin und PEVK gelöst ist, erfolgt eine verstärkte Kontraktion, Dies konnte auch bei PEVK-Knockout-Kardiomyozyten beobachtet werden, da hier ebenfalls keine PEVK-Aktin-Interaktion stattfinden kann. Wieso jedoch die kontraktile Eigenschaften im PEVK defizienten Herzen geringer sind als im Wildtyp ist unklar. Es wäre möglich, dass Veränderungen der hormonellen Regulation *in vivo* oder der Extrazellulären Matrix der verstärkten Kontraktilität der Kardiomyozyten entgegenwirken. Letzteres konnte anhand von Trichrom gefärbten Herzschnitten jedoch nicht bestätigt werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der PEVK Region hauptsächlich eine mechanische Funktion zukommt, da die heterozyot PEVK defizienten Zellen einen intermediären Phänotyp aufweisen. Sie zeigen aber auch, dass die PEVK-Region von Titin, durch Interaktion mit Aktin, die Systole beeinflussen kann.

Bei Verlust der N2B Region auf einem Allel kann die kontraktile Fehlfunktion kompensiert werden. Sowohl die Kontraktilität der heterozygoten Kardiomyozyten, als auch der Wandstress im isolierten Herzen, von heterozygot und homozygot N2B defizienten Tieren, ist unter unbehandelten Bedingungen nicht verändert. Die N2B Region besitzt somit keinen Einfluss auf die Systole. Der Frank-Starling-Mechanismus wird durch die erhöhte Steifheit der N2B defizienten Titins nicht beeinflusst.

## **6.5 Die I-Bande als Schnittstelle zwischen Signaltransduktion und Biomechanik**

Bei Dehnung und Kontraktion werden die Bereiche von Titin unterschiedlich belastet. In der Z-Scheibe wird das Dehnungssignal nicht nur von Titin an seine Bindungspartner weitergegeben, sondern kann zusätzlich noch durch Aktomyosin-basierte Dehnung und von Spannungen über das Sarkolemm beeinflusst werden. Das dicke Filament kann ein wenig durch Aktomyosin-basierte und Titin-basierte

---

passive Spannung gedehnt werden, und auch die M-Linie erhält mechanische Beeinflussung von Actomyosin- und Titin basierter Spannung. Letztendlich ist nur die I-Bande von Titin unabhängig von Aktomyosin basierter Kraft. Die mechanische Kraft die hier detektiert werden kann ist somit nur auf die Dehnung von Titin zurückzuführen (Granzier and Labeit, 2004). N2B und die N2A Region von Titin sind daher die wahren Dehnungssensoren von auf Titin basierter Spannung. Die Interaktion von diesen Regionen mit Ihren Bindungspartnern sollte daher Dehnung in biochemische Signale umwandeln. Die Deletion in der I-Bande sollte sich somit auch auf die Signalgenerierung auswirken und durch die erhöhte Steifheit von Titin erhöhten Dehnungsstress auslösen.

Ein Faktor der bei Stress bzw. erhöhter Belastung hochreguliert wird ist ANP. Es ist bei Hypertrophie erhöht, wirkt jedoch der Hypertrophie entgegen, indem es negativ regulierend in den MAPK Signalweg eingreift (Hayashi et al., 2004). Überexpression von ANP führt zu einem verringerten Herzgewicht (Barbee et al., 1994). Sowohl im unstimulierten Tieren als auch nach achttägiger adrenerger Stimulation ist der ANP Spiegel im N2B Knockout im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Dehnung von Titin wird u.a. an der Z-Scheibe detektiert. Hier ist Titin mit T-Cap verbunden (Gregorio et al., 1998). T-Cap interagiert mit dem Muskel Lim Domänen Protein MLP (Knoll et al., 2002). MLP wird schon früh in der Muskelentwicklung exprimiert und spielt bei der Ausbildung der Cytoarchitektur eine wichtige Rolle. Der MLP Knockout zeigt einen DCM Phänotyp (Arber et al., 1997). Dieser Titin-T-Cap-MLP-Komplex ist in der Lage Dehnung an der Z-Scheibe zu detektieren. Der MLP Knockout zeigt in Zellkultur nach dehnungsinduziertem Stress im Gegensatz zum Wildtyp nämlich keine Änderung von ANP (Knoll et al., 2002). Die erhöhte Expression von ANP im N2B Knockout könnte daher auf der erhöhten Steifheit von Titin beruhen. Das N2B-defiziente Titin würde demnach schon früher auf Dehnung reagieren und über T-cap an MLP weiterleiten. Dieses wäre mit der Beobachtung vereinbar, dass der heterozygot defiziente N2B Knockout ebenfalls einen leicht erhöhten ANP Spiegel zwischen Wildtyp und Knockout besitzt.

Weiterhin konnte eine erhöhte adrenerge Stimulierbarkeit im N2B Knockout, nicht jedoch im PEVK Knockout, nachgewiesen werden. Sie zeigt sich im N2B Knockout an einem erhöhten entwickelten Wandstress im isoliert arbeitenden Herzen und auch in isolierten Kardiomyozyten ist eine erhöhte Kontraktilität nach Behandlung mit Isoproterenol zu beobachten.



Nach adrenerger Stimulation konnte auch ein erhöhter ANP Spiegel bei dem Knockout des N2B Bindungspartners FHL2 beobachtet werden (Kong et al., 2001). Im  $\alpha$ B-Crystallin-Knockout ist vergleichbar dem N2B-Knockout die prozentuale Verkürzung (FS) in der Echokardiographie erhöht. Ebenso ist die ANP Menge leicht erhöht (Morrison et al., 2004). Somit zeigen die Knockouts beider Bindungspartner der N2B Region Phänotypen, die auch beim N2B Knockout zu beobachten sind. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Proteinkomplex an der N2B Region (mit FHL2 und  $\alpha$ B-Crystallin) in die Regulation der Antwort auf adrenerge Stimulation, bzw. erhöhten Stress eingebunden ist.

Es konnte im Westernblot gezeigt werden, dass FHL2 im N2B Knockout herunterreguliert ist. Im heterozygot N2B defizientem Tier ist nur ca. 1/3 der FHL2 Proteinmenge und im N2B Knockout nur ca. 1/8 der Proteinmenge vom Wildtyp vorhanden. Es konnte jedoch, trotz der geringen FHL2 Proteinmenge, ein Signal in der Immunfluoreszenzanalyse in der I-Bande der N2B-defizienten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. FHL2 ist demnach durch die Deletion der N2B Region nicht mislokalisiert. Dieses könnte auf die Existenz weiterer Bindungsstellen von FHL2 in der I-Bande hinweisen. Diese könnten entweder in Titin oder in anderen Strukturproteinen zu finden sein.

Die Regulation von FHL2 scheint im N2B Knockout auf translationaler Ebene stattzufinden, da die mRNA Menge von FHL2 nicht verändert ist, wie durch eine Real Time RT-PCR Analyse gezeigt wurde. Die Regulation der Translation scheint jedoch entscheidend vom Vorhandensein der N2B Region bzw. der Dehnung dieser Region abzuhängen. Denn im PEVK Knockout, in dem die N2B Region stärker belastet sein dürfte, ist eine erhöhte Expression von FHL2 nachzuweisen.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, besitzt FHL2 unterschiedliche Funktionen. So kann es als Plattform für metabolische Enzyme dienen, als auch in die Signaltransduktion durch Interaktion mit ERK eingreifen, aber auch als Transkriptionsfaktor tätig und möglicherweise auch am Spleißen, beteiligt sein. Für eine Übersicht der Funktionen von FHL2 siehe Johannessen (Johannessen et al., 2006).

Die Expression von FHL2 hat auch klinische Relevanz. Sie ist in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie herunterreguliert (Muller et al., 2000). Nach einer Koronar-Bypass-Operation ist FHL2 hingegen hochreguliert (Wan et al., 2002). Das deutet darauf hin, dass FHL2 belastungsabhängig reguliert wird. Bei normaler

---

Belastung wird FHL2 stark exprimiert, im dilatativen Herzen, in welchem die Kontraktilität eingeschränkt ist, ist die Expression von FHL2 reduziert. Nach koronarem Bypass, wenn das Herz wieder stärker schlägt, erhöht sich ebenso die FHL2 Expression. Diese belastungsabhängige Expression von FHL2 spricht für eine Regulation über die dehnungssensitive N2B Region von Titin. Auch die erhöhte Expression von FHL2 im PEVK Knockout, in dem die N2B Region stärker belastet sein dürfte als im Wildtyp, deutet auf diesen Regulationsmechanismus hin. Weiterhin konnte Matsumoto und Mitarbeiter bei einer Mutation in der N2B Region (Ser3799 Thy) eine erhöhte Bindung von FHL2 feststellen (Matsumoto et al., 2006). Patienten mit dieser Mutation entwickeln eine hypertrophe Kardiomyopathie.

Der zweite Bindungspartner der N2B Region ist  $\alpha$ B-Crystallin. Dieses Chaperon wird nach Ischämie phosphoryliert und zeigt damit eine erhöhte Bindung an die Z-Scheibe bzw. I-Bande (Golenhofen et al., 1998; Golenhofen et al., 2002). Durch Erhalt der korrekten Faltung seines Bindungspartners schützt es die Kardiomyozyten vor stressinduziertem Zelltod, wie er auch bei Ischämie vorkommt (Morrison et al., 2003).  $\alpha$ B-Crystallin ist auch für die richtige Faltung der elastischen Bereiche von Titin nach Stress wichtig und unterstützt somit die elastischen Eigenschaften von Titin.

Auch für  $\alpha$ B-Crystallin, konnte keine Mislokalisation nach Deletion der N2B Region festgestellt werden. Dies überrascht nicht, da  $\alpha$ B-Crystallin noch weitere Bindungsstellen in der I-Bande von Titin besitzt (Bullard et al., 2004). Es bindet u.a. an die IG Domänen zwischen der N2B und der PEVK Region, sowie in der PEVK Region selbst und stabilisiert diese (Bullard et al., 2004). Die Proteinmenge von  $\alpha$ B-Crystallin ist durch den Verlust der N2B Region im Tier unter Normalbedingungen nicht beeinflusst. Im PEVK Knockout jedoch zeigt sich eine erhöhte  $\alpha$ B-Crystallin Expression, was auf einen erhöhten mechanischen Stress hindeuten könnte.

Beide N2B Bindungspartner können den RAF/MEK/ERK Signalweg beeinflussen. Dies ist insofern von Bedeutung, als dieser Signalweg, an dem auch PKC $\alpha$  beteiligt ist, bei der Entwicklung von Hypertrophie eine Rolle spielt (Braz et al., 2002). PKC $\alpha$  ist in der Lage dehnungsinduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in Kardiomyozyten zu unterbinden (Pan et al., 2005). FHL2 kann durch Bindung an ERK2 dessen Transport nach Phosphorylierung in den Kern verhindern (Purcell et al., 2004). Auch  $\alpha$ B-Crystallin kann negativ in den RAF/MEK/ERK Signalweg eingreifen. Diese Aktivierung führt zusätzlich zur Steigerung der Expression von PKC $\alpha$  (Liu et al., 2004).

Somit können beide N2B Bindungspartner FHL2 und  $\alpha$ B-Crystallin negativ regulierend auf ERK2 einwirken. Es wäre möglich, dass die N2B Region von Titin hierbei eine Funktion besitzt, indem die Möglichkeit der Bindung an diese Region durch Dehnung verändert wird. „Freies“ FHL2 bzw.  $\alpha$ B-crystallin könnte dann Regulierend in der RAF/MEK/ERK Signalweg eingreifen.

Der zweite signalgenerierende Komplex in der I-Bande von Titin befindet sich an der N2A Region. Hier können die Proteine CARP, DARP und Ankard2 binden.

Die mRNA Menge von CARP wurde in der Real Time RT-PCR analysiert. CARP, welches bei Hypertrophie hochreguliert wird (Aihara et al., 2000), ist im N2B Knockout im Vergleich zum Wildtyp nicht unterschiedlich reguliert. Der Verlust der N2B Region und die damit verbundene erhöhte Steifheit des Sarkomers besitzen daher keinen Einfluss auf die Expressionsniveau von CARP.

## 6.6 Weiterführende Studien

In zukünftigen Arbeiten ist zu klären, wie sich der Verlust von N2B und PEVK auf die Herzfunktion im belasteten Herzen auswirkt. Hierzu sollen die Tiere diastolisch durch Arterien-Venen-Shunt im Volumen und systolisch durch Verengung der Aorta „Aortic-Banding“ in der Kontraktion belastet werden. Hierdurch wird eine Hypertrophie hervorgerufen, da das Herz überlastet wird. Signale, welche durch Dehnung von Titin verursacht werden treten früher bzw. stärker hervor. Die Suche nach diesen Signalwegen soll hier über 2D Gelelektrophorese und Affymetrixchipanalysen vorangetrieben werden.

Eine besondere Rolle muss hier der Untersuchung von FHL2 zukommen, da FHL2 wie bereits erwähnt, belastungsabhängig reguliert wird, und auch eine erhöhte Bindung von FHL2 an Titin zur Ausprägung einer HCM führt (Matsumoto et al., 2006). Dabei sollte einerseits die Lokalisation von FHL2 nach Dehnung bzw. Überlastung, andererseits die Interaktion und Lokalisierung von ERK2, einem Bindungspartner von FHL2 untersucht werden. Auch, ob und wann FHL2 transkriptional wirksam ist, wäre von Interesse, um die von FHL2 regulierten Proteine und die Beteiligung an krankheitsauslösenden Signalwegen aufzuklären.

Die Untersuchung der metabolischen Funktion von FHL2 wird ebenfalls in zukünftigen Arbeiten eine Rolle spielen. Da FHL2 als molekulare Plattform für metabolische Enzyme dient und im N2B Knockout translational herunterreguliert ist, wäre es denkbar, dass auch die hieran bindenden Enzyme wie Kreatin-Kinase,

Phosphofruktokinase und Adenylat-Kinase in ihrer Wirkungsweise oder Expression beeinträchtigt sind. Neben quantitativen Westernblotuntersuchungen dieser Proteine könnte man auch den Energiestoffwechsel im N2B Knockout z.B. durch Bestimmung von metabolischen Zwischen- und Endprodukten, oder auch die ATP Konzentration im Muskel untersuchen.

Weiterhin wären die Stressantwort-Proteine CARP, DARP und MLP von Interesse, da die N2A Region, aber auch der dehungsensitive Bereich in der Z-Scheibe durch den Verlust dieser elastischen Domänen in ihren Funktionen beeinträchtigt sein könnten. Dehnungsreize würden z.B. durch die erhöhte Steifheit von Titin früher ausgelöst. Hier gilt es Änderungen in der Proteinmenge, Phosphorylierung und Lokalisation vor bzw. nach Belastung zu bestimmen

Ebenfalls sollten die Druck–Volumen Verhältnisse vom PEVK Knockout bestimmt werden um einen besseren Einblick auf die Auswirkungen auf den Frank-Starling-Mechanismus zu erlangen. Wie die Ergebnisse der Kontraktionsmessung an isolierten Kardiomyozyten zeigten, weisen die PEVK defizienten Zellen eine erhöhte Kontraktion auf. Es wäre daher möglich, dass durch den Verlust der Interaktion von PEVK mit Aktin während der Diastole, die Regulation der Systole betroffen ist.

Auch der Einfluss von  $Ca^{2+}$  auf die Funktion der Molekularen Bremse PEVK, bzw. auf seinen Interaktionspartner S100A1 ist zu untersuchen. Bei Messungen der Kontraktion an isolierten Kardiomyozyten von PEVK-defizienten Tieren ist zu erwarten, dass diese Zellen eine weniger stark gesteigerte Reaktion auf einen erhöhten  $Ca^{2+}$  Spiegel zeigen als die Wildtyp-Zellen. Hier kann noch die kontraktile Reserve der PEVK Bindung verfügbar gemacht werden. Die Kontraktilität sollte sich bei Wildtyp und PEVK Knockout Zellen bei hohen  $Ca^{2+}$  Konzentrationen angleichen. Bei geringen  $Ca^{2+}$  Konzentrationen sollte die Kontraktilität im Wildtyp geringer sein.

Letztendlich werden auch gealterte N2B- und PEVK-Knockout-Tiere auf die Ausprägung von dilatativer Kardiomyopathie und Hypertrophie hin untersucht werden. Diese Krankheitsbilder treten beim Menschen auch erst im gesetzten Alter auf. Erste vorläufige Untersuchungen legen nahe, dass der PEVK Knockout zur Ausprägung einer dilatativen Kardiomyopathie in gealterten männlichen Tieren führen kann. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet müssen folgen, um einen besseren Einblick in die Entstehung von Herzerkrankungen zu erlangen.

## 6.7 Abschließende Bewertung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dieser Arbeit zwei neue Knockout-Modelle von Titin etabliert werden konnten. Sie liefern einen Einblick in die Mechanik des Sarkomers und in die Funktion des Herzens.

N2B und PEVK Knockout sind nicht embryonal letal, entwickeln sich normal und sind daher für die weitere Analyse der Herzfunktion zugänglich. Eine essentielle Funktion der N2B Region während der Sarkomerogenese kann daher ausgeschlossen werden.

Der PEVK Knockout ist in seiner kontraktilen Funktion gegensätzlich zum N2B Knockout. In beiden wird eine elastische Domäne von Titin deletiert. Doch während der N2B Knockout eine erhöhte Kontraktilität im Tier und eine geringere Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten aufweist, ist es im PEVK Knockout gerade umgekehrt. Hier sind die Kardiomyozyten kontraktiler, das Herz jedoch weniger stark kontraktil.

Damit zeigen beide Knockouts auf Zellebene die erwarteten veränderten kontraktilen Eigenschaften. Im Organ jedoch werden diese veränderten, „weicheren“ (PEVK KO) oder steiferen (N2B KO) Eigenschaften von Titin, kompensiert. Hierdurch kann das Herz im unbelasteten Zustand in seinen normalen Parametern arbeiten, bzw. seine normale Pumpleistung erbringen.

Weiterhin konnte eine unterschiedliche Expression des N2B Bindungspartners FHL2 in beiden Knockoutmodellen aufgezeigt werden. Die Interaktion von Titin und FHL2 könnte eine Rolle bei der Entwicklung von Herzkrankheiten spielen (Gerull et al., 2002; Matsumoto et al., 2006).

Somit geben die beiden Knockouts der N2B und PEVK Region die Möglichkeit, die Interaktion von Titin und FHL2 *in vivo*, unter unterschiedlichen physiologischen Belastungen, zu untersuchen. Hierdurch können sie möglicherweise als Werkzeug für die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung von Herzkrankheiten wie diastolischer Dysfunktion eingesetzt werden.