

# **Pathophysiologie der Signaltransduktion durch die Titinkinase-Domäne**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katy Raddatz

aus Anklam

12/2006

**1. Gutachter: Prof. Michael Gotthardt**

**2. Gutachter: Prof. Udo Heinemann**

**Disputation am: 8. März 2007**

# Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Gotthardt für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe: Uta, Steffi, Katrin, Beate, Ulrike, Chen, Yu, Micha, Nora, Thiru, Cathrin und Agnieszka möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und jede Menge Spaß im Labor danken. Besonderer Dank gilt hierbei Beate Goldbrich für ihre Unterstützung bei den Genotypisierungen, der Real Time PCR und bei Klonierungen. Agnieszka danke ich für die Einführung in die Immunpräzipitationsanalyse, sowie dem Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die Zusammenarbeit bei den isolierten Herzexperimenten, sowie der Kraftbestimmung von einzelnen Muskelfasern möchte ich mich ganz herzlich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Henk Granzier, im Besonderen bei Jun Peng von der Washington State Universität in Pullman bedanken.

Ich möchte mich weiterhin bei Dirk Albrecht, Falko Hochgräfe und Dörte Becher von der AG Hecker an der Universität Greifswald für die massenspektrometrischen Untersuchungen bedanken. Durch Euch wurde es möglich neue Einblicke in das Herz- und Skelettmuskel-Proteom von *Mus Musculus* zu gewinnen.

Mein Dank gilt auch folgenden Arbeitsgruppen und Mitarbeitern des MDCs:  
der AG Willnow für die Bereitstellung zahlreicher Geräte, sowie anregender Gespräche, Norbert Henke für die Einführung in den NF $\kappa$ B-Assay und Bettina Erdmann für die Elektronenmikroskopieanalyse.

Dr. Ronald Vetter und Ursula Jakob Müller von der FU danke ich für die Unterstützung bei der Serca-Aktivitätsmessung.

Meinem Freund Falko danke ich für die vielen anregenden und aufbauenden Gespräche am Wochenende, für das Korrekturlesen der Arbeit und für die Unterstützung beim Nachweis von Thiol modifizierten Proteinen.

**Auch darf nicht geleugnet werden, dass wir persönlich einem Buche gar manchen Druckfehler verzeihen, indem wir uns durch dessen Entdeckung geschmeichelt fühlen.**

Johann Wolfgang von Goethe

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Aufbau und Funktion des Muskels</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Titin</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Titin-Isoformen .....	4
1.2.2 Titin-Domänenstruktur.....	5
1.2.3 Titinkinase.....	9
1.2.4 Titinmutationen in Tiermodellen .....	10
1.2.5 Klinische Relevanz.....	11
1.2.6 Titinkinase-KO-Modelle .....	12
<b>1.3 Zielstellung der Arbeit</b> .....	<b>13</b>
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 Chemikalien .....	15
2.1.2 Enzyme.....	15
2.1.3 Antikörper .....	15
2.1.4 Oligonukleotide.....	17
2.1.5 Sonden.....	17
2.1.6 Bakterien und Hefestämme .....	19
2.1.7 Vektoren.....	20
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Tierexperimentelle Praxis .....	20
2.2.2 Klonierungen.....	20
2.2.3 Genotypisierung der Titinkinase- und Mdm-KO-Tiere .....	20
2.2.4 SDS-Gelelektrophorese.....	21
2.2.5 Proteinbestimmung.....	22
2.2.6 Western Blot.....	22
2.2.7 Titin Agarose Gels .....	23
2.2.8 2D-Gelelektrophorese .....	24

2.2.9	Nachweis von modifizierten Thiolgruppen in Cysteinen.....	26
2.2.10	EMSA.....	27
2.2.11	Immunfärbung von Kryoschnitten .....	29
2.2.12	Elektronenmikroskopie .....	30
2.2.13	Apoptosebestimmung.....	30
2.2.14	Real Time PCR.....	31
2.2.15	Tamoxifenbehandlung.....	32
2.2.16	Versuche an isolierten Herzen.....	32
2.2.17	Spannungsmessung einzelner Myofibrillen .....	33
2.2.18	Serca2 Aktivitätsbestimmung .....	34
2.2.19	Y2H-Screen.....	35
2.2.20	Pulldownanalyse in C2C12-Zellen.....	39
2.2.21	Pulldownanalyse in <i>E. coli</i> .....	41
2.2.22	Statistik.....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der M-Banden Region von Titin in skelettmuskelspezifischen Titinkinase-KO-Mäusen .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Deletion der Titinkinase-region führt zur Atrophie im Quadriceps und Hypertrophie im Herzen.....	45
3.1.2	Strukturelle Veränderungen des Titinkinase-region-defizienten Sarkomers.....	45
3.1.3	Unvollständige Sarkomerintegration und Verlust des kontinuierlichen Titinfilaments in Titinkinase-region-KO-Tieren .....	46
3.1.4	Erhöhte Synthese von Stress-induzierten Proteinen in den Titinkinase-region-KO-Mäusen ab dem Tag 10 .....	50
3.1.5	Der Verlust der Titinkinase-region hat keine Auswirkung auf die Proteinmenge von M-Banden bindenden Proteinen.....	57
3.1.6	Oxidativer Stress in Titinkinase-region-KO-Tieren .....	58
3.1.7	NFκB wird in den Titinkinase-region-KO-Tieren nicht aktiviert .....	60
3.1.8	Deletion der Titinkinase-region führt zur Apoptose im Quadriceps.....	60
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der M-Banden Region von Titin in induzierbaren herzspezifischen Titinkinase-KO-Mäusen .....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Deletion der Titinkinase-region durch Tamoxifeninjektion.....	63

3.2.2	Deletion der Titinkinaseregion führt zur kardialer Hypertrophie im induzierbaren Titinkinaseregion-KO.....	64
3.2.3	Reduzierte adrenerge Signaltransduktion in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren .....	64
3.2.4	Die Integration der M- und A-Bande von Titin in das Sarkomer ist in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäusen gestört.....	66
3.2.5	Erhöhte Synthese von Stress-induzierten Proteinen in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren.....	69
3.2.6	Expressionsanalyse der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tiere .....	72
3.2.7	Proteinanalyse der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tiere .....	74
3.2.8	Mislokalisierung von PKC $\delta$ in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren .....	77
3.2.9	Erhöhte Serca2 Aktivität in den Titinkinaseregion-KO-Tieren .....	78
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der Titin-N2A Domäne in Mdm KO-Mäusen.....</b>	<b>79</b>
3.3.1	Vermehrte Synthese von Stress-induzierten Proteinen in Mdm-Mäusen .....	80
3.3.2	Unveränderte Calpain 3 Proteinmenge in Titinkinaseregion- und Mdm-KO-Mäusen .....	82
3.3.3	Unveränderte Titinstruktur in den 32 Tage alten Mdm-KO-Tieren.....	82
<b>3.4</b>	<b>Identifizierung neuer Interaktionspartner der Titinkinase .....</b>	<b>83</b>
3.4.1	Yeast Two Hybrid-Screen.....	84
3.4.2	Interaktionsstudien in <i>E. coli</i> .....	86
3.4.3	Interaktionsstudien in C2C12-Zellen .....	88
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
<b>4.1</b>	<b>Titins M-Bande stabilisiert die Sarkomerstruktur im Herz- und Skelettmuskel .....</b>	<b>90</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Sarkomerolyse im Titin M-Band KO führt zur Aktivierung einer generellen Stressantwort .....</b>	<b>92</b>
<b>4.3</b>	<b>Deletion der Titinkinaseregion führt zu oxidativem Stress.....</b>	<b>94</b>
<b>4.4</b>	<b>Unterschiede in der Adaptation des Stoffwechsels in Titinkinaseregion-KO- Herzen und Skelettmuskel.....</b>	<b>97</b>
<b>4.5</b>	<b>Deletionen in der I- und M-Bande von Titin führen zu ähnlichem Skelettmuskel-Phänotyp .....</b>	<b>97</b>

<b>4.6 Deletion der Titinkinaseregion führt zur Hypertrophie im Herzen und Atrophie</b>	
<b>im Skelettmuskel .....</b>	<b>100</b>
<b>4.7 Titin beeinflusst die systolische Funktion des Herzens .....</b>	<b>102</b>
<b>4.8 Mögliche Substrate der Titinkinase.....</b>	<b>105</b>
<b>4.9 Aussicht .....</b>	<b>106</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>110</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>112</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>130</b>
<b>8.1 Quantifizierungsdaten der Proteomanalysen .....</b>	<b>130</b>
8.1.1 Proteomanalyse des skelettmuskel-spezifischen Titinkinaseregion-KO.....	130
8.1.2 Proteomanalyse des induzierbaren herzspezifischen Titinkinaseregion-KO .....	132
8.1.3 Proteomanalyse des Titin-I-Banden-KO (Mdm).....	133
<b>8.2 Anfertigung eines Herz- und Quadriceps-Mastergels für Proteomanalysen .....</b>	<b>134</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>156</b>
<b>10 Veröffentlichungen .....</b>	<b>158</b>