

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des Muskels

Die gestreifte Muskulatur im Herz- und Skelettmuskel besteht aus vielkernigen Zellen, die von einer elektrisch erregbaren Membran, dem Sarkolemm umgeben sind. Eine Muskelzelle enthält viele im Zytoplasma parallel angeordnete Myofibrillen, die wiederum aus vielen Funktionseinheiten, den Sarkomeren bestehen. Jedes Sarkomer enthält dünne (9 nm) und dicke (15 nm) Proteinfilamente. Der Bereich der dicken Proteinfilamente wird auch als A-Bande bezeichnet, die dünnen Proteinfilamente bilden die I-Bande. In der Mitte des Sarkomers befindet sich die M-Bande. Jedes Sarkomer wird durch die Z-Scheibe begrenzt, in der die dünnen Proteinfilamente benachbarter Sarkomere überlappen (Abb. 1.1). Sie sind aus Aktin, Tropomyosin und Troponin zusammengesetzt, während die dicken Proteinfilamente Myosin enthalten. Die leichten Ketten des Myosins überlappen mit Aktin und bilden so Querbrücken zwischen beiden Filamentsystemen, was entscheidend für die Kontraktionsfähigkeit des Muskels ist.

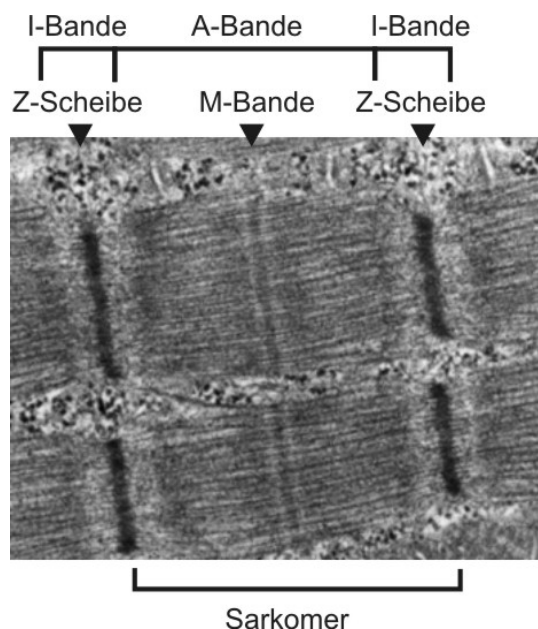


Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Skelettmuskels

Dargestellt ist ein Sarkomer mit den begrenzenden Z-Scheiben, der zentralen M-Bande, sowie der dunklen A-Bande (dickes Filamentsystem) und der hellen I-Bande (dünnen Filamentsystem).

Während im Skelettmuskel die Kontraktion nur durch ein elektrisches Signal (Aktionspotential) vom Rückenmark induziert werden kann, löst das Herz die Aktionspotentiale im Sinusknoten selbst aus. Sowohl im Herz-, als auch im Skelettmuskel führen die Aktionspotentiale zur Öffnung von Calciumkanälen in der Membran und im sarkoplasmatischen Retikulum, so dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht wird. Die

Bindung von Ca^{2+} an Troponin bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch sich das Tropomyosin-Filament verschiebt. Dies wiederum ermöglicht die Bindung der Myosinköpfe an Aktin. Durch Abspaltung von ADP verschieben sich die Myosinköpfe, so dass sich das Aktinfilament zur Mitte des Sarkomers hin bewegt. Da sich die Myosinköpfe am anderen Ende desselben Filaments in die entgegengesetzte Richtung bewegen, kommt es zu einer Verkürzung des Sarkomers. Die Bindung von ATP an den Myosinkopf führt zur Ablösung des Myosins von Aktin. Anschließend wird ATP hydrolysiert und die dabei freiwerdende Energie zur Rückstellung des Myosinkopfes in die Ausgangsposition genutzt (Abb. 1.2). Gleichzeitig sinkt der Ca^{2+} -Spiegel in der Zelle, da Calcium durch die ATPase Serca2 und den $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Antiporter in das sarkoplasmatische Retikulum bzw. aus der Zelle transportiert wird.

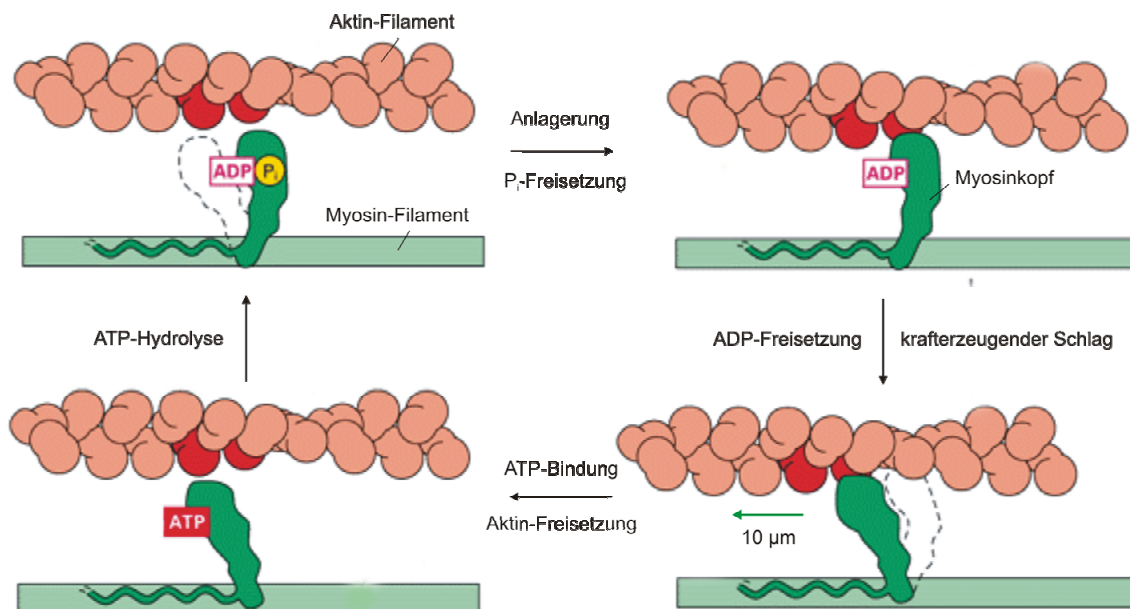


Abb. 1.2: Muskelkontraktion

Im Ruhezustand sind die Aktinfilamente von den Myosinfilamenten getrennt. Bei hohen intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen binden die Myosinköpfe an Aktin. Durch Abspaltung von ADP verschieben sie sich, so dass sich das Aktinfilament zur Mitte des Sarkomers hin bewegt. Die Bindung von ATP an den Myosinkopf führt zur Ablösung des Myosins von Aktin. Anschließend wird ATP hydrolysiert und die dabei freiwerdende Energie zur Rückstellung des Myosinkopfes in die Ausgangsposition genutzt (Rayment et al., 1993).

Die Skelettmuskulatur kann zwei unterschiedliche Typen von Muskelzellen, abhängig von der ATP-Produktion, enthalten. Typ I (Slow Twitch) Muskelfasern haben mehr Mitochondrien und speichern Sauerstoff in Myoglobin. Sie haben einen aeroben Stoffwechsel und produzieren ATP sehr langsam. Typ II (Fast Twitch) Muskelfasern metabolisieren ATP

schneller und können dadurch stärker kontrahieren. Sie haben weniger Mitochondrien und akkumulieren im Skelettmuskel schneller Laktat. Typ I Muskelfasern kommen z.B. vermehrt im Triceps surae vor, während der Quadriceps mehr Fast Twitch Muskelfasern enthält. Die gestreifte Muskulatur des Herzens hingegen besteht ausschließlich aus Typ II Muskelfasern.

1.2 Titin

Connectin (Titin) wurde erstmals 1977 als ein elastisches Protein des Muskels beschrieben (Maruyama et al., 1977). Zwei Jahre später konnte durch Gelelektrophorese ein Protein im Megadalton-Bereich aufgetrennt werden, das aufgrund seiner Größe nach den Titanen aus der griechischen Mythologie benannt wurde (Wang et al., 1979). Später wurde festgestellt, dass Titin und Connectin identisch sind, wobei sich der Name Titin bis heute durchgesetzt hat.

Titin ist mit bis zu 3,7 MDa das größte Protein in Säugetieren und bildet neben Aktin und Myosin das dritte Filamentsystem im Herz- und Skelettmuskel (Labeit et al., 1992; Labeit und Kolmerer, 1995). Ein Molekül erstreckt sich von der Z-Scheibe über die I- und A-Bande bis zur M-Bande des Sarkomers. Sowohl in der Z-Scheibe als auch in der M-Bande überlappen gegenläufige Moleküle, so dass Titin ein kontinuierliches Filamentsystem über die gesamte Myofibrille ausbildet (Abb. 1.3). Das menschliche Titin besteht aus 297 Immunglobulin-Repeats und Fibronectin III-Domänen, die insgesamt 90 % der Masse von Titin ausmachen (Muhle-Goll et al., 2001; Improta et al., 1998).

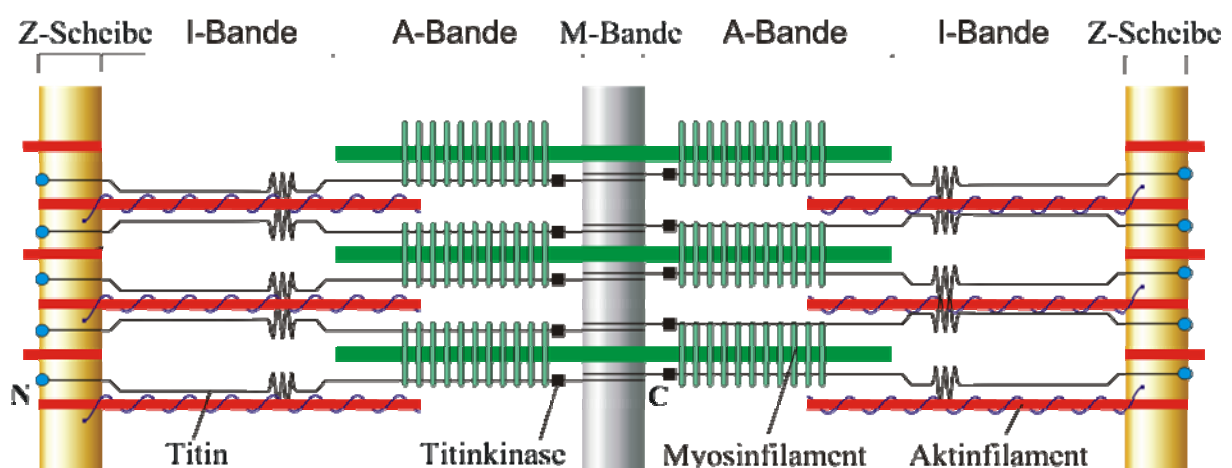


Abb. 1.3: Sarkomerstruktur

Titin integriert von der Z-Scheibe über die I- und A-Bande bis zur M-Bande des Sarkomers. An der Z-Scheibe und M-Bande überlappen gegenläufige Moleküle, so dass Titin ein kontinuierliches Filamentsystem über die gesamte Myofibrille ausbildet. Modifiziert von (Gregorio et al., 1999).

1.2.1 Titin-Isoformen

Das Titin im Menschen besteht aus 363 Exons, die alternativ gespleißt werden können und dadurch die Elastizität des Sarkomers beeinflussen (Bang et al., 2001a). Die N2A-Isoform wird nur im Skelettmuskel exprimiert, sie enthält im Vergleich zu Titinisoformen des Herzmuskels eine längere PEVK Region und eine größere Anzahl von Tandem Immunglobulin-Domänen, welche die Elastizität des Muskels erhöhen. Im Herzen hingegen wird hauptsächlich die kürzere N2B- und zu einem geringeren Anteil auch eine Mischisoform aus N2A und N2B (N2BA) gebildet. Die N2B-Isoform enthält eine kürzere PEVK-Region, die den Herzmuskel steifer macht und eine N2B-Domäne, die im Skelettmuskel nicht auftritt (Freiburg et al., 2000; Bang et al., 2001a; Cazorla et al., 2000).

Durch alternatives Spleißen der Z-Scheiben- und I-Banden-Region von Titin können zusätzliche Isoformen im Skelettmuskel und Herzen gebildet werden. Die unterschiedliche Expression der Z-Repeats bestimmt die Anzahl der Titin-Aktinin-Querbrücken und beeinflusst dadurch die mechanischen Eigenschaften der Z-Scheibe (Sorimachi et al., 1997). Die Novex 1, 2 und 3 Isoformen von Titin entstehen durch alternatives Spleißen der I-Bande. Die kurze Novex 3 Isoform (700 kDa) vermittelt den Einbau der langen Titinisoformen (3 MDa) in das Sarkomer und interagiert außerdem mit Obscurin, das bei der Signaltransduktion der Myofibrillen eine Rolle spielt (Bang et al., 2001a) (Abb. 1.4).

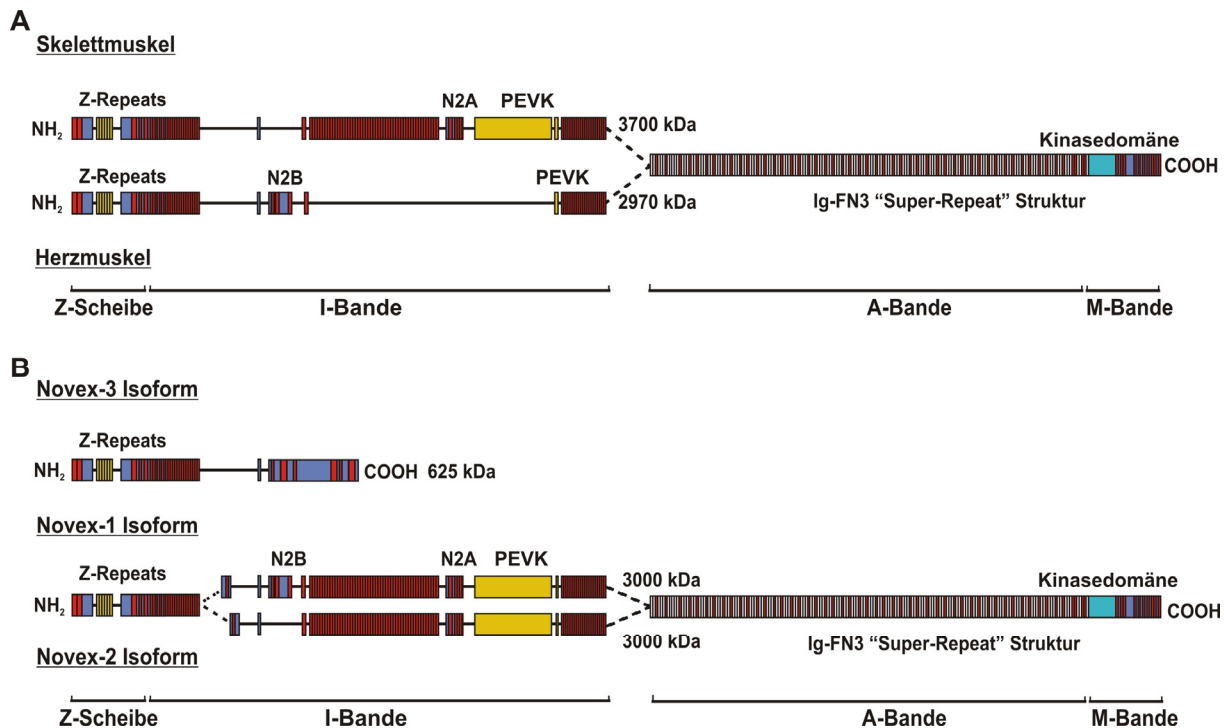


Abb. 1.4 Titin-Isoformen

Dargestellt ist die Skelettmuskel-spezifische N2A-Isoform von Titin und die kürzere Herz-spezifische N2B-Isoform mit den dazugehörigen Domänen (A). Im Herzen wird außerdem die N2BA Isoform exprimiert (nicht dargestellt). Durch alternatives Spleißen der Z-Scheiben- und I-Banden-Region von Titin können zusätzliche Isoformen (Novex-1, -2,-3) im Herzen und im Skelettmuskel entstehen (B). Modifiziert von (Bang et al., 2001a)

1.2.2 Titin-Domänenstruktur

1.2.2.1 Z-Scheibe

Titin ist aus verschiedenen Domänen mit unterschiedlichen Funktionen zusammengesetzt. Der N-Terminus (ca. 80 kDa) integriert in die Z-Scheibe des Sarkomers und ist mit dem dünnen Filamentsystem über α -Aktinin verbunden (Gregorio et al., 1998; Gregorio et al., 1999). Titins Z-Scheibe enthält weiterhin multiple Proteinbindungsstellen (Abb. 1.5). Das sarkoplasmatische small ankyrin 1 Protein (sANK1) interagiert mit den aminoterminalen Ig-Repeats Z1 und Z2 von Titin und positioniert dadurch das sarkoplasmatische Retikulum (SR) an die Z-Scheibe des Sarkomers (Kontrogianni-Konstantopoulos und Bloch, 2003).

Obscurin, das an die Z9-10 Repeats von Titin bindet (Young et al., 2001b) besteht ähnlich wie Titin aus multiplen Ig-Domänen (Young et al., 2001b). Sein Ca^{2+} /Calmodulin Bindemotiv und seine Rho guanine nucleotide exchange factor-Domäne weisen auf eine Rolle in der Signaltransduktion hin (Young et al., 2001b; Sanger und Sanger, 2001). Obscurin interagiert

u.a. mit Ankyrin 1,5, welches das SR an das Sarkomer bindet und die Verteilung des Ryanodinerezeptors (RyR) im SR regelt (Bagnato et al., 2003).

Telethonin (Tcap) bindet wie sANK1 an die aminoterminalen Ig-Repeats Z1 und Z2 von Titin (Gregorio et al., 1998; Mues et al., 1998) und interagiert außerdem mit der Untereinheit des Kaliumkanals minK/isk (Furukawa et al., 2001), mit dem Muscle Lim Protein (MLP) (Knoll et al., 2002), sANK1 (Kontrogianni-Konstantopoulos und Bloch, 2003), Myostatin (Nicholas et al., 2002) und Mitgliedern der Calsarcin Familie (Calsarcin 1, 2, 3) (Frey und Olson, 2002). In C2C12 Zellen inhibiert Tcap die Sekretion von Myostatin, einem negativen Regulator des Muskelwachstums (Nicholas et al., 2002). Außerdem wird Tcap zusammen mit MLP eine Rolle als Dehnungssensor zugeschrieben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Brain Natriuretic Peptide (BNP) und der Atrial Natriuretic Factor (ANP) in MLP-KO Mäusen nicht mehr durch Dehnung induziert werden (Knoll et al., 2002). MLP ist außerdem ein wichtiger Regulator der Myozytendifferenzierung, da es die Bindung von MyoD an die DNA erhöht (Kong et al., 1997). Weiterhin interagiert es mit zahlreichen Proteinen des Sarkolemm, wie z.B. Vinculin (Arber et al., 1997) und Nrap (Gehmlich et al., 2004) und ist in der Organisation des Zytoskeletts involviert (Arber et al., 1997).

Sowohl Tcap, als auch MLP binden an Mitglieder der Calsarcinfamilie (Frey und Olson, 2002; Heineke et al., 2005), die wiederum mit der Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Phosphatase Calcineurin (CaN) interagieren (Frey et al., 2000; Frey et al., 2004). Die Aktivierung von Calcineurin durch mechanischen Stress über MLP (Wang et al., 2001; Heineke et al., 2005), Veränderungen in der Sarkomerintegrität (Sussman et al., 1999) oder Herzwachstum-fördernde Agonisten (Crabtree und Olson, 2002; Hogan et al., 2003), führt zur Dephosphorylierung und Kerntranslokation von Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie. Überexpression von Calcineurin im Herzen führt zur Hypertrophie und Kardiomyopathie (Franco et al., 1998; Molkentin et al., 1998), während im Skelettmuskel Fast Twitch Muskelfasern zu Slow Twitch Muskelfasern umgewandelt werden (Chin et al., 1998; Delling et al., 2000).

1.2.2 I-Bande

Die I-Bande von Titin (800 kDa-1,5 MDa) besteht aus Tandem-Immunglobulindomänen (Ig), einer Prolin- (P), Glutamat- (E), Valin- (V) und Lysin- (K) reichen Region (PEVK) und der Skelettmuskel-spezifischen N2A- oder der Herz-spezifischen N2B-Domäne (Labeit und Kolmerer, 1995). Bei der Dehnung des Sarkomers können die Sequenzen zwischen den Ig-

Domänen entfaltet und die PEVK-Region, sowie die N2A/N2B-Domäne verlängert werden, wodurch eine passive Kraft aufgebaut wird. Titins I-Bande wirkt daher wie eine molekulare Feder, welche die Elastizität des Sarkomers bestimmt (Trombitas et al., 1999; Linke und Granzier, 1998; Watanabe et al., 2002). Wie bereits erwähnt, ist die Elastizität der Myofibrillen aufgrund der längeren N2A-Isoform im Skelettmuskel höher, als bei der kürzeren N2B-Isoform im Herzen. Die Elastizität im Herzen kann zusätzlich noch durch den Anteil der elastischeren N2BA-Isoform bestimmt werden (Labeit und Kolmerer, 1995). Yamasaki konnte weiterhin zeigen, dass adrenerge Stimulation über den β -Rezeptor zur Phosphorylierung der N2B-Domäne durch die Proteinkinase A (PKA) führt, wodurch die passive Spannung herabgesetzt und die diastolischen Eigenschaften des Herzens beeinflusst werden (Yamasaki et al., 2002).

Die N2A- und N2B-Domänen enthalten außerdem verschiedene Bindungsstellen für Signalmoleküle (Abb. 1.5). Das Four and a half LIM domain Protein FHL2 (DRAL) stellt die Energieversorgung der Z-Scheibe und I-Bande des Sarkomers sicher, da es metabolische Enzyme, wie die Phosphofruktokinase (PFK), die Creatinkinase (CC) und die Adenylatkinase mit Titins N2B-Domäne verbindet (Lange et al., 2002). FHL2-KO Mäuse zeigen ein vermehrtes Herzwachstum nach β -adrenerger Stimulation, was auf eine antihypertrophe Wirkung von FHL2 hinweist (Kong et al., 2001). Die N2B-Domäne von Titin interagiert neben FHL2 auch mit dem kleinen Hitzeschockprotein α B-Crystallin (Bullard et al., 2004). Golenhofen konnte zeigen, dass α B-Crystallin nach Ischemie und Überbelastung des Herzmuskels an die I-Bande von Titin bindet, um die für die Elastizität benötigten Ig-Domänen zu schützen (Golenhofen et al., 2002).

Die Cysteinprotease Calpain 3 bindet an die N2A-Domäne von Titin (Ono et al., 2004) und ist an der Myofibrillogenese und dem Sarkomeraufbau beteiligt (Kramerova et al., 2004). Weiterhin induziert Calpain 3 die Proteolyse verschiedener Muskelproteine, wie Titin, Talin, Ezrin, Filamin C and Vinexin (Taveau et al., 2003). Die MARP-Proteinfamilie, zu denen das Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP), das Diabetes Ankyrin Repeat Protein (DARP) und das Ankyrin Repeat Domain Protein Ankrd2/Arpp gehören, wird vermehrt bei erhöhter Belastung und Stress induziert und kann ebenfalls an die N2A-Region von Titin, N-terminal zu Calpain 3, binden (Bang et al., 2001b). CARP reguliert die Nkx2.5-abhängige Genexpression im Herz- und Skelettmuskel während der Entwicklung (Jeyaseelan et al., 1997; Baumeister et al., 1997) und bindet außerdem an Myopalladin, was die Sarkomerintegrität beeinflusst (Bang et al., 2001b).

1.2.2.3 A-Bande

Die A-Bande von Titin (2 MDa) enthält 11 x 11 Super-Repeat-Strukturen, bestehend aus Fibronectin Typ III (FnIII)-Repeats und Ig-Domänen (Labeit et al., 1992; Labeit und Kolmerer, 1995), die mit Myosin (Wang et al., 1992) und dem Myosin Binding Protein C (MyBPC) interagieren (Freiburg und Gautel, 1996) (Abb. 1.5). Das carboxyterminale Ende von MyBPC bindet ebenfalls an Myosin (Okagaki et al., 1993). Es wird angenommen, dass Titin die Anzahl und Lokalisierung der MyBPC- und Myosinmoleküle, die in das dicke Filamentsystem eingebaut werden, kontrolliert (Gregorio et al., 1999).

1.2.2.4 M-Bande

Das carboxyterminale Ende von Titin (200 kDa) liegt in der M-Bande des Sarkomers und enthält multiple Proteinbindungsstellen (Abb. 1.5). Das Strukturprotein Myomesin bindet an die m4-Domäne von Titins M-Bande und kann durch die Überlappung zweier entgegengesetzt verlaufender Titinmoleküle an der M-Bande dimerisieren (Obermann et al., 1996; Nave et al., 1989). Es enthält wie Titin zahlreiche Ig und Fn3 Domänen, sowie eine Serine/Prolin-reiche Region (ähnlich der PEVK-Region von Titin), die als molekulare Feder wirken und passive Spannung aufbauen (Obermann et al., 1996). Die Interaktion von Myomesin mit Myosin verbindet das dicke Filamentsystem mit Titin (Bahler et al., 1985).

Titins M-Bande enthält weiterhin Bindungsstellen für Calpain 3 (Kinbara et al., 1997) und FHL2 (Lange et al., 2002), die beide auch an die I-Bande von Titin binden. Durch die Überlappung zweier entgegengesetzt verlaufender Titinmoleküle an der M-Bande kann Calpain 3 mit Murf1 interagieren, das ebenfalls an die M-Bande von Titin bindet (Gregorio et al., 1999). Bisher ist die Funktion dieser Assoziation unklar. Beide Proteine spielen bei Ubiquitinylierungs- und Degradationsprozessen eine Rolle. Die Spaltung von Muskelproteinen durch Calpain 3 führt zur Ubiquitnylierung und Abbau dieser Proteine durch das 26S-Proteasom (Hasselgren und Fischer, 2001), während Murf1, eine Ubiquitin Ligase mit Ubiquitin related modifier 3 (SUMO-3) interagiert (Dai und Liew, 2001). Murf1 bildet außerdem Heterodimere mit den homologen Proteinen Murf2 und Murf3 (Centner et al., 2001), die in der Stabilisierung von Mikrotubuli involviert sind (Spencer et al., 2000; Pizon et al., 2002). Weiterhin scheint Murf1 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion einzunehmen, da es mit dem Transkriptionsregulator Glucocorticoid Modulatory Element Binding Protein (GMEB-1) (McElhinny et al., 2002) und dem Rezeptor der Proteinkinase C

(PKC) RACK1 interagiert (Arya et al., 2004). Durch Bindung an RACK1 wird die Translokation von PKC ϵ an die Fokalen Adhäsionen verhindert und die Aktivierung von Hypertrophiesignalen inhibiert (Arya et al., 2004). In zahlreichen Atrophie-Modellen ist Murf1 hochreguliert (Bodine et al., 2001), was für eine antihypertrophe Wirkung spricht. An der M-Bande von Titin bindet Murf1 N-terminal zu einer Kinasedomäne (1.2.3) (Centner et al., 2001), die Details dieser Interaktion konnten aber bisher nicht geklärt werden.

1.2.3 Titinkinase

Titins M-Bande enthält eine Serin/Treonin-Kinase (Abb. 1.5), die zur Familie der Myosin Light Chain-Kinasen gehört. Sie besteht aus einer katalytischen und regulatorischen Domäne und ist hochkonserviert in Vertebraten und Invertebraten, was auf eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion des Muskels hindeutet (Gautel et al., 1995). Im Gegensatz zu anderen Kinasen, die durch eine Serin- oder Tyrosin-Phosphorylierung von einer geschlossenen in eine offene Konformation übergehen, ist die Titinkinase bereits in ihrer autoinhibierten Form in der offenen Konformation. Die Aktivierung der Kinase erfolgt über die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes (Y170) in der P+1 Schleife und Bindung von Ca²⁺/Calmodulin.

Ein postuliertes Substrat der Titinkinase ist Tcap. In differenzierenden Myofibrillen wird Tcap von der Titinkinase phosphoryliert, was auf eine Rolle der Titinkinase in der Myofibrillogenese hinweist (Mayans et al., 1998). Neuere Untersuchungen zeigen hingegen, dass in Titinkinase-region-defizienten Tieren das Sarkomer bis zum embryonalen Tag E10,5 normal aufgebaut wird und Tcap erst am Tag E15,5 nach der Myofibrillogenese exprimiert wird (Weinert et al., 2006).

Weitere postulierte Substrate der Titinkinase sind Neighbor of Brca gene (Nbr1) und p62 (Sequestosom 1) (Lange et al., 2005), die beide von der Titinkinase phosphoryliert werden. p62 interagiert außerdem mit Murf2, ein Homolog von Murf1, das bei der Stabilisierung von Mikrotubuli und in der Myofibrillogenese eine Rolle spielt (Pizon et al., 2002). Bei mechanischem Stillstand bindet Murf2 nicht länger an Nbr1 und p62 und translokiert in den Kern, wo es die Transkriptionsaktivität des Serum Response Factors (SRF) inhibiert und die Menge an SRF reduziert (Lange et al., 2005). Die Titinkinase kontrolliert demnach sowohl die Protein-, als auch die Genexpression im Muskel.

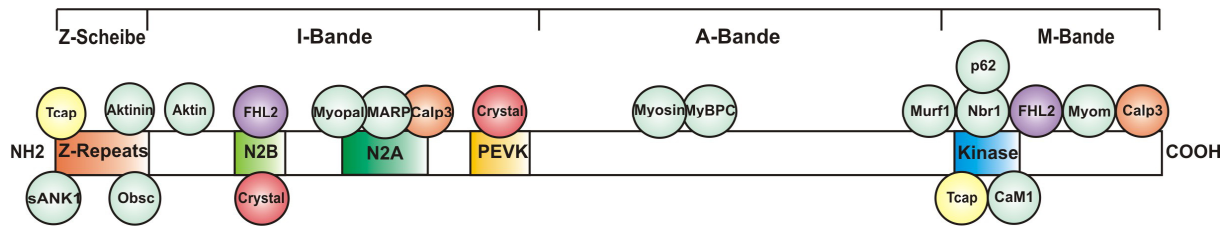


Abb. 1.5: Interaktionspartner von Titin

Dargestellt sind alle Proteine, die mit den Domänen der Z-Scheibe, I-, A- und M-Bande von Titin interagieren, Obsc-Obseurin, Crystal- α B-Crystallin, Myopal-Myopalladin, MARP-CARP/Ankrd2, Calp3-Calpain 3, CaM1-Calmodulin 1 und Myom-Myomesin. Proteine, die miteinander interagieren wie Nbr1/p62, MyPBC/Myosin und Myop/MARP/Calp3 sind überlappend dargestellt. Tcap (gelb), Calp3 (orange), FHL2 (lila) und Crystallin (rot) binden an mehr als eine Titindomäne. Die N2B Domäne von Titin wird ausschließlich im Herzen exprimiert, während die N2A Domäne hauptsächlich im Skelettmuskel und zu einem geringeren Anteil auch im Herzen vorkommt.

1.2.4 Titinmutationen in Tiermodellen

Die Funktion von Titin und seiner Domänen wurde bisher in zahlreichen Studien und verschiedenen Tiermodellen, wie Zebrafisch, Maus, Drosophila und *C. elegans* untersucht.

Im Zebrafisch z.B. wurde die Translation der herzspezifische N2B-Region durch Injektion von Morpholino Antisense RNA verhindert. Die daraus resultierenden pic^{m171}-Mutanten haben ein dünneres Myokard und einen reduzierten systolischen Druck. Außerdem ist die Anzahl der Myofibrillen und die Kontraktilität beeinträchtigt (Xu et al., 2002), was auf eine Rolle von Titin in der Sarkomerassemblierung hinweist.

Dies wird auch durch Untersuchungen in verschiedenen Maus-Modellen gestützt. Die Muskeldystrophie/Myositis (Mdm) Mutation trat spontan bei Mäusen im Jackson Labor auf und wird durch eine Deletion von 83 Aminosäuren und eine Insertion eines LINE Retrotransposons in der N2A Region von Titin verursacht, wobei die Bindungsstelle für die Cysteinprotease Calpain 3 fehlt. Homozygote KO-Mäuse entwickeln ab der 2.-3. Lebenswoche eine schwere Muskelschwäche der distalen und proximalen Skelettmuskel ohne Beeinträchtigung des Herzens und sterben im Alter von zwei Monaten (Garvey et al., 2002). Die embryonal letale shrunken head-Mutation (shru) betrifft ebenfalls Titins I-Bande. Der Verlust der Titinfunktion in den mutierten Mäusen führt zu Herzinsuffizienz, veränderter vaskulärer Morphogenese und vermehrten Absterben von Mesenchymzellen (May et al., 2004).

Die Entdeckung von Titinhomologen in *Drosophila* und *C. elegans* weist auch auf eine wichtige Rolle von Titin in Invertebraten hin. *C. elegans* enthält das mini-Titin TWITCHIN, das an Myosin bindet. Es wird angenommen, dass TWITCHIN die Aktivität von Myosin reguliert, da in TWITCHIN-Mutanten (*unc-22*) die Kontraktilität des Sarkomers gestört ist und Mutationen im Myosin Heavy Chain-Gen die Ausbildung des Phänotyps verhindern (Waterston et al., 1980; Moerman et al., 1988).

Drosophila exprimiert zwei Titinhomologe, D-Titin (2 MDa), das alternativ zu Kettin (500 kDa) gespleißt werden kann und Projektin (1,2 MDa) (Machado und Andrew, 2000). Die Deletion von Projektin (*bent*-Mutante) führt zum Tod während der späten Embryonalentwicklung, wobei die Muskelkontraktion nicht beeinträchtigt ist (Fyrberg et al., 1992; Ayme-Southgate et al., 1995). Mutationen im D-Titin hingegen führen zu Defekten in der Myoblastenfusion und Muskelorganisation, sowie Beeinträchtigungen in der Chromosomenkondensation, Schwesterchromatidbildung und dem Verlust von Diploidität (Machado und Andrew, 2000). Titin scheint daher auch in der Stabilisierung von Chromosomen involviert zu sein.

1.2.5 Klinische Relevanz

Titin hat eine hohe klinische Relevanz, da Mutationen im Titingen zur Beeinträchtigung der Herz- und Skelettmuskelfunktion und zur Ausbildung von (Kardio-) Myopathien führen.

Die Tibiale Muskeldystrophie (TMD) ist eine autosomal dominante Krankheit, die zwischen dem 35-45 Lebensjahr auftritt und zur Muskelschwäche und Atrophie der unteren Beinmuskeln, speziell des Tibialis anterior führt (Udd et al., 1991). In diesen Patienten konnten zwei Mutationen im M-Banden Exon 6 von Titin (Titinexon 363) identifiziert werden, eine 11 bp Mutation die zu vier veränderten Aminosäuren führt und eine 1 bp Mutation, die einen Austausch von Leucin zu Prolin bewirkt. Beide Mutationen führen zu einer veränderten Struktur des M-Banden-Bereichs von Titin (MEx2 bis MEx6). Da in dieser Region die Titinkinase liegt und zahlreiche Proteine, wie Calpain 3, Murf1, FHL2 und Myomesin binden, konnte nicht eindeutig geklärt werden, was die Muskeldystrophie verursacht (Hackman et al., 2002).

Die „Hereditary Myopathy with Early Respiratory Failure“ (HMERF) ist ebenfalls eine autosomal dominante Muskeldystrophie, die die oberen und unteren Extremitäten, sowie die Nackenmuskulatur und die Atemwege beeinflusst und zum Tod durch Atemstillstand führt (Edstrom et al., 1990). Die Krankheit wird durch einen Aminosäureaustausch von Arginin zu

Tryptophan in der regulatorischen Domäne der Titinkinaseregion verursacht. Dadurch kann Nbr1 nicht mehr an die Titinkinase binden und ist in den betroffenen Patienten mislokalisiert und reduziert (Lange et al., 2005).

Die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) tritt zu 20-30% durch Vererbung auf und wird durch Genmutationen in zytoskeletalen, kontraktilen und inneren Kernmembran-Proteinen verursacht (Seidman und Seidman, 2001). Eine 2 bp Mutation im Titinexon 326 führt zu einer Änderung des Leserahmens, so dass eine verkürztes Titin (1,14 MDa) entsteht. Weiterhin konnte in DCM-Patienten eine Mutation im Übergang von der Z-Scheibe zur I-Bande (Titinexon 18) identifiziert werden, die einen Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Arginin bewirkt. Durch die veränderte Struktur der Immunglobulindomäne-Z4 ist möglicherweise die Organisation der Z-Bande gestört (Gerull et al., 2002).

Vier weitere Mutationen in der Z-Bande und N2B-Region von Titin wurden von Itoh-Satoh beschrieben (Itoh-Satoh et al., 2002). Bei den beiden erstgenannten handelt es sich um Aminosäureaustausche (Val54Met und Ala743Val), die die Bindungsaffinitäten von Tcap bzw. α -Aktinin an Titin beeinflussen. Die Mutationen in der N2B-Region von Titin führen zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Aspartat (Ser4465Asp) und zur Generierung eines Stopcodons (Gln4053ter), so dass ein verkürztes Titin entsteht (Itoh-Satoh et al., 2002).

Titin ist nicht nur durch die Genmutationen in der klinischen Forschung relevant, sondern auch durch sein verändertes Expressionslevel bei Herzinsuffizienz. In DCM-Patienten nimmt die Gesamtmenge von Titin um 47% ab, während das Verhältnis von N2BA-Isoform zu N2B-Isoform zunimmt (Makarenko et al., 2004).

Alle bisher publizierten Mutationen im Titingen führen entweder zu einem Skelettmuskelphänotyp ohne Beeinträchtigung des Herzens oder beeinträchtigen das Herz, aber nicht den Skelettmuskel. Daher scheint Titin unterschiedliche Signalwege im Herzen und im Skelettmuskel zu beeinflussen.

1.2.6 Titinkinase-KO-Modelle

Um die Funktion der Titinkinasedomäne aufzuklären, wurden sowohl Titinkinase-defiziente-Tiermodelle, als auch Zelllinien generiert. Die Deletion der regulatorischen Titinkinasedomäne und nachfolgender Teile der M-Bande führte in heterozygoten Myoblastenklonen zu verkürzten Myotubes und einer schwächeren Ausbildung der M-Bande und Z-Scheibe. Sowohl Titin, als auch Myosin waren runterreguliert. Die Ergebnisse weisen

auf eine wichtige Rolle von Titins M-Bande in der Organisation der Z-Scheibe und M-Bande während der Myofibrillogenese hin (Miller et al., 2003).

Ähnliche Ergebnisse wurden 2006 von Musa publiziert. Die Entfernung der gesamten M-Bande von Titin in ES-Zellen, die zu Kardiomyozyten differenziert wurden, führte zu Defekten in der Myofibrillogenese. Heterozygote Zellen zeigten keine Beeinträchtigung, was darauf hinweist, dass ein intaktes Titingen ausreicht um normale Sarkomere aufzubauen. Zahlreiche M-Banden und Z-Scheiben-bindende Proteine waren in den homozygoten Zellen mislokalisiert, was darauf hindeutet, dass Titins M-Bande in der Myosinfilament-Assemblierung und Ausbildung der M-Bande und der Z-Scheibe involviert ist (Musa et al., 2006).

Im Gegensatz dazu konnte Weinert zeigen, dass die initialen Schritte der Sarkomerassemblierung unabhängig von Titins M-Bande sind, während das Breitenwachstum der ausgebildeten Sarkomere in Titinkinase-defizienten Herzen gestört war (Weinert et al., 2006).

Beim Titinkinase-KO-Modell von Gotthardt wurde das M-Banden Exon 1, das die Titinkinase enthält, und das M-Banden Exon 2, zur Erhaltung des offenen Leserahmens, mit LoxP-Sequenzen flankiert. Die Deletion der M-Banden-Exons im Herzen durch eine Cre-Rekombinase, unter der Kontrolle des α -MHC-Promotors, führte zur frühen embryonalen Lethalität der homozygoten Mäuse, was auf eine wichtige Rolle Titins während der Embryonalentwicklung hinweist (Gotthardt et al., 2003). Die Verwendung einer Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des muskelspezifischen Creatinkinase-Promotors hingegen führte zur Deletion des M-Banden Exons 1 und 2 in der gestreiften Muskulatur und zu lebensfähigen KO-Tieren. Diese entwickelten ab der 3. Lebenswoche eine Muskelschwäche und starben nach 5 Wochen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen vom Herzen zeigten, dass sich das Sarkomer in den KO-Tieren auflöste. Außerdem war das M-Banden bindende Protein Murf1 mislokalisiert, sowie die dehnungssensitiven Proteine Carp und Ankrd2 im KO-Herzen hochreguliert. Die Ergebnisse deuten daher auf eine Rolle von Titins M-Bande in der Aufrechterhaltung der Sarkomerstruktur, sowie in der Signaltransduktion des Muskels hin (Gotthardt et al., 2003).

1.3 Zielstellung der Arbeit

Titin ist das größte Protein in Säugetieren und bildet neben Aktin und Myosin das dritte Filamentsystem im Herz- und Skelettmuskel. Das Titinmolekül erstreckt sich von der Z-

Scheibe über die I- und A-Bande bis zur M-Bande des Sarkomers. Die verschiedenen Domänen Titins übernehmen unterschiedliche Funktionen. Der C-Terminus enthält eine Serin-Threonin-Kinasedomäne, die in Vertebraten hochkonserviert ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Titinkinase in der Protein- und Genexpression (Lange et al., 2005), Myofibrillogenese (Mayans et al., 1998; Miller et al., 2003; Musa et al., 2006) und Aufrechterhaltung der Sarkomerstruktur (Weinert et al., 2006) involviert ist. Obwohl der Titinkinase eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des Muskels zugeschrieben wird, sind bisher nur wenige *in vitro*-Substrate bekannt.

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese, sollte die Funktion der Titinkinasedomäne und möglicher Signalwege stromabwärts dieser im Herz- und Skelettmuskel näher untersucht werden. Mögliche neue Substrate sollten über Y2H-Screens, Immunpräzipitationen und massenspektrometrische Analysen identifiziert werden. Für die Untersuchungen standen zwei Titinkinaseregion-KO-Modelle zur Verfügung. Das konditionelle Titinkinaseregion-KO-Modell von Gotthardt beinhaltet die Deletion des M-Banden Exons 1 und 2 von Titin in der gestreiften Muskulatur (Gotthardt et al., 2003). Dieses Modell eignet sich besonders, um Unterschiede in der Signaltransduktion der Titinkinase im Herzen und im Skelettmuskel zu detektieren. Da die bisher publizierten Mutationen im Titingen entweder zu einem Skelettmuskelphänotyp oder zu einem Herzphänotyp führen, scheint Titin unterschiedliche Signalwege im Herzen und im Skelettmuskel zu beeinflussen. Da die Titinkinaseregion-KO-Tiere bereits mit 5 Wochen sterben (Gotthardt et al., 2003), sollte ein induzierbares KO-Modell generiert werden, um den Herzphänotyp in der adulten Maus näher untersuchen zu können.