3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der M-Banden Region von Titin in skelettmuskelspezifischen Titinkinase-KO-Mäusen

Für die Untersuchungen der M-Bande von Titin wurde ein konditioneller Knockout verwendet (Gotthardt et al., 2003). Dabei sind die Exons MEx1 (Kinaseregion) und MEx2 (zur Erhaltung des offenen Leserahmens) der Titin M-Bande von LoxP-Sequenzen flankiert und können durch Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des MCK (Muscle Creatine Kinase) Promotors deletiert werden. Die Rekombination erfolgt in der gestreiften Muskulatur ab dem embryonalen Tag E15 (Abb. 3.1). Die Knockout-Mäuse entwickeln nach 3 Wochen eine progressive Muskelschwäche und sterben im Alter von 5 Wochen (Gotthardt et al., 2003).

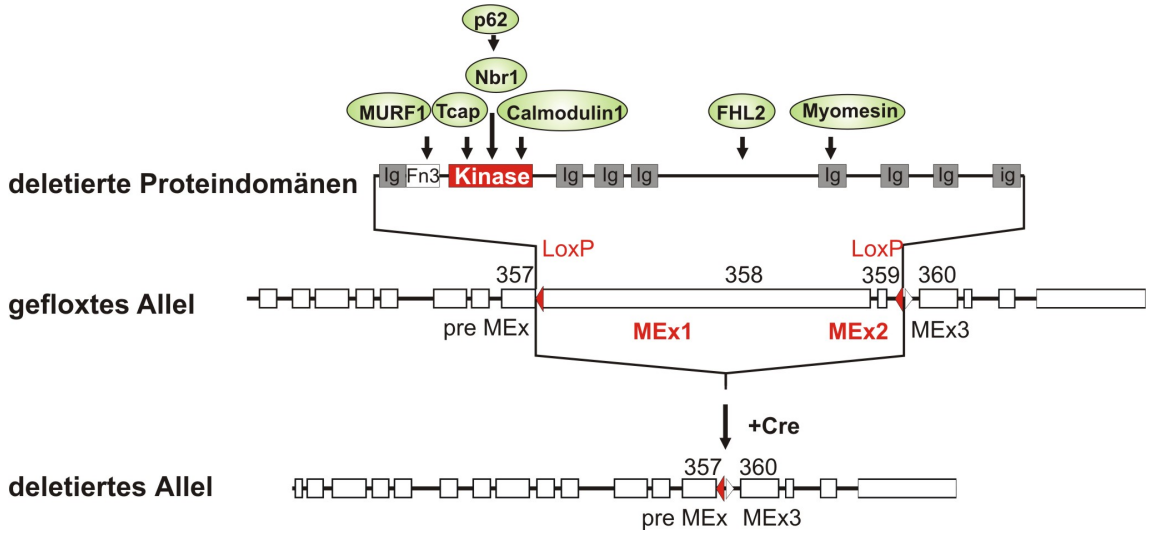


Abb. 3.1 Deletierte Protein- und DNA-Bereiche in den Titinkinaseregion-KO-Tieren

Die M-Banden Exons MEx1 und MEx2 von Titin wurden mit LoxP-Sequenzen flankiert und durch Verpaarung von Lox homozygoten Tieren mit Cre positiven Tieren in der gestreiften Muskulatur deletiert. Titin-Bindeproteine sind in Grün dargestellt, Ig – Immunglobulin Domäne, Fn3 – Fibronektin Typ 3 Domäne. Modifiziert nach (Gotthardt et al., 2003).

3.1.1 Deletion der Titinkinaseregion führt zur Atrophie im Quadriceps und Hypertrophie im Herzen

Zur Charakterisierung der Titinkinaseregion-KO-Tiere wurde das Verhältnis von Quadriceps- und Herzgewicht zum Körpergewicht bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Gewicht des Quadriceps in den KO-Tieren in Abhängigkeit zum Körpergewicht abnimmt, während das Herzgewicht zunimmt (Abb. 3.2).

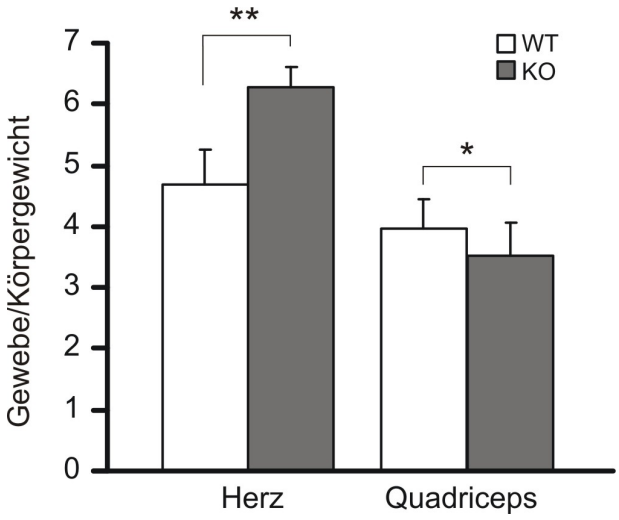


Abb. 3.2: Deletion der Titinkinaseregion führt zu Atrophie im Quadriceps und Hypertrophie im Herzen
Dargestellt ist das Verhältnis von Herz- und Quadricepsgewicht zum Körpergewicht in 30 Tage alten Titinkinaseregion-KO- und Kontroll-Mäusen (n=7). **(P<0,01), *(P<0,05)

3.1.2 Strukturelle Veränderungen des Titinkinaseregion-defizienten Sarkomers

Um zu überprüfen, ob die Deletion der M-Bande von Titin zu Veränderungen in der Sarkomerstruktur führt, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen des Quadriceps von 5 und 10 Tage alten WT- und KO-Tieren durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Sarkomer bei den 5 Tage alten Tieren sowohl im WT als auch im KO vollständig und intakt ausgebildet war (Abb. 3.3 A).

Im Gegensatz dazu zeigten die 10 Tage alten KO-Tiere bereits Veränderungen in der Sarkomerstruktur. Etwa 30% der Sarkomere waren nicht mehr einheitlich angeordnet und wirkten verschoben oder begannen sich aufzulösen. Dabei scheint die Auflösung von der M-Bande her auszugehen, da einige Sarkomere, bei denen keine M-Bande mehr sichtbar war, noch intakte Z-Scheiben aufwiesen (Abb. 3.3 B).

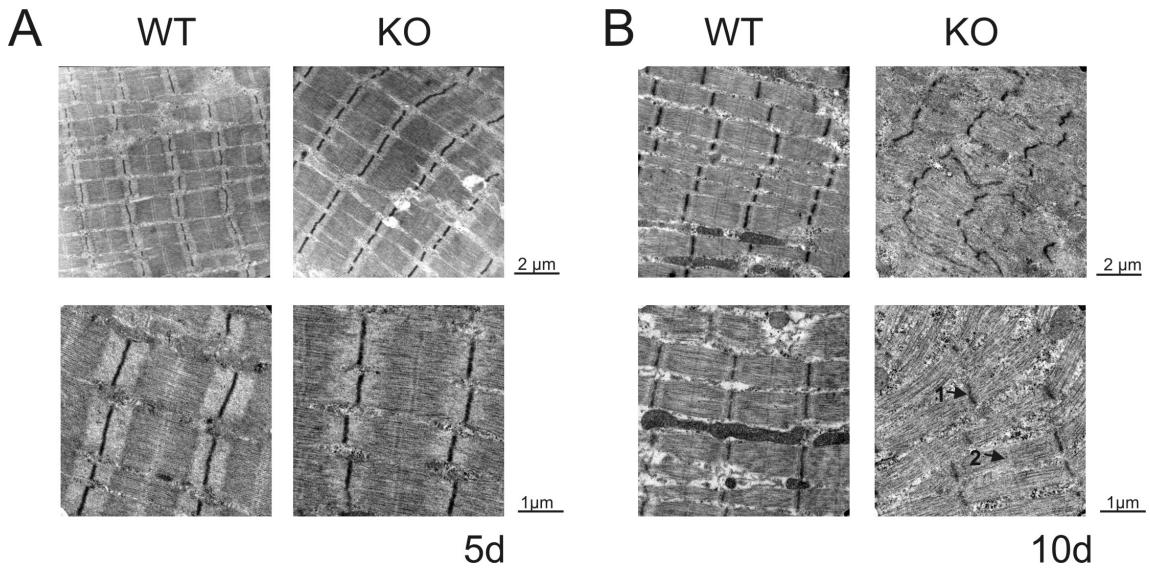


Abb. 3.3: Auflösung der Sarkomerstruktur im Quadriceps der 10 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Mäuse

Die 5 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Tiere zeigten im Vergleich zum WT keine Unterschiede im Sarkomeraufbau (A). Bei den 10 Tage alten KO-Tieren waren etwa 30 % der Sarkomere ungeordnet oder aufgelöst, wobei die M-Bande (2) häufig nicht mehr sichtbar war, während die Z-Scheibe (1) noch normal strukturiert war (B).

3.1.3 Unvollständige Sarkomerintegration und Verlust des kontinuierlichen Titinfilaments in Titinkinaseregion-KO-Tieren

Um die Ergebnisse der EM-Analyse zu verifizieren, wurden Kryoschnitte von 20 Tage alten WT- und KO-Tieren angefertigt und mit Antikörpern gegen verschiedene Domänen von Titin, sowie Titin-bindende Proteine gefärbt (Abb. 3.4).

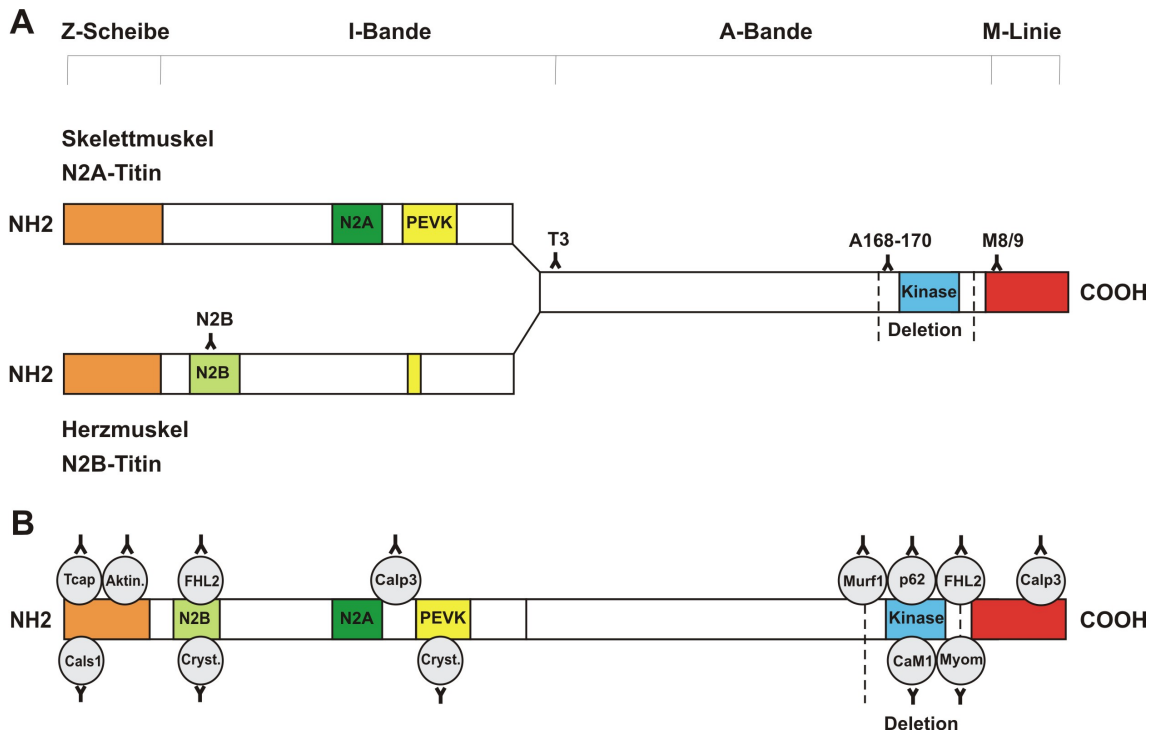
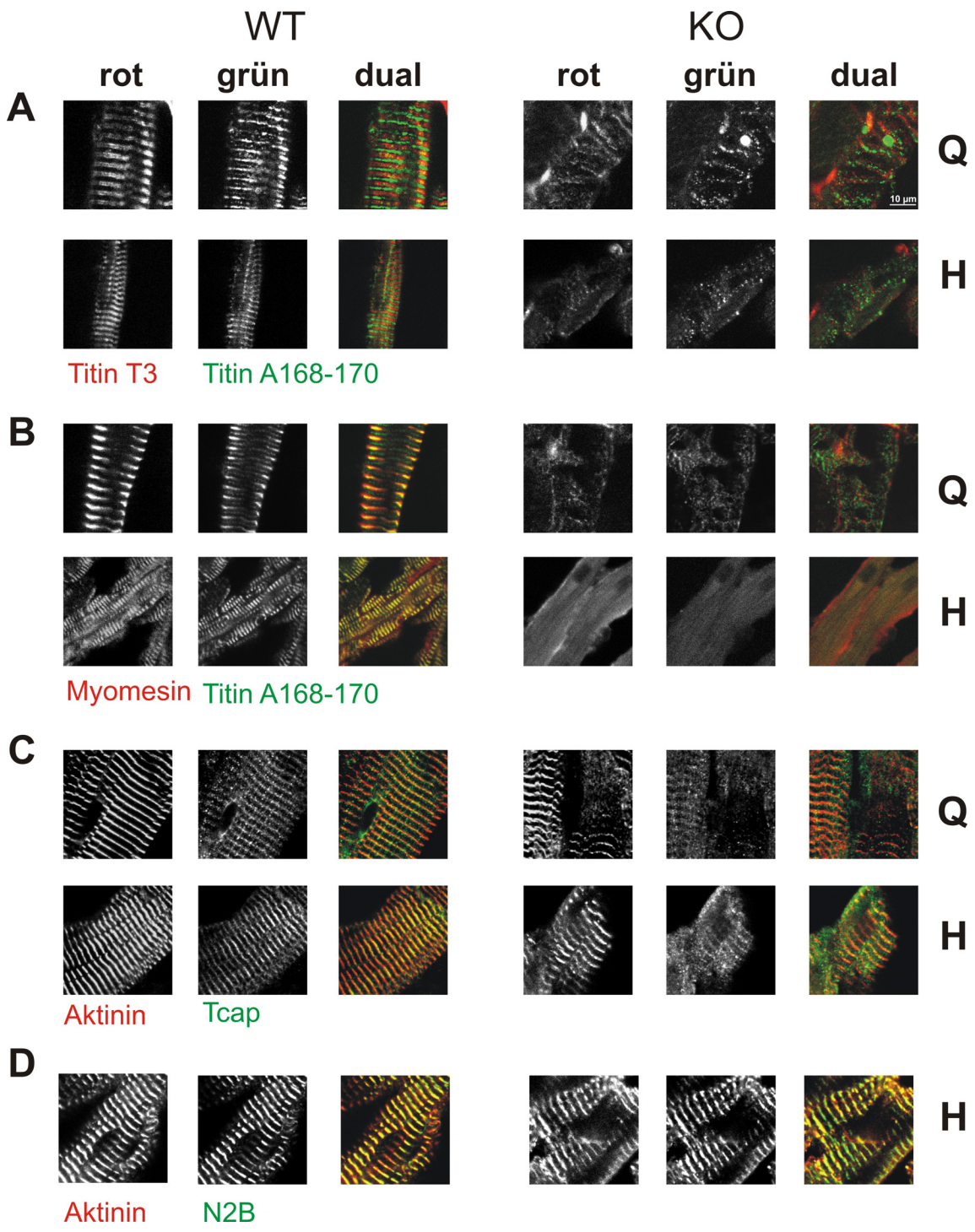


Abb. 3.4: Lokalisation der verwendeten Antikörper gegen Titin und Titin-bindende Proteine
Dargestellt sind die Bindungsstellen der verwendeten Titinantikörper (A), sowie der Titin-bindenden Proteine, Calp3-Calpain 3, Myom-Myomesin, CaM1-Calmodulin 1, Crystal-αB-Crystallin, Cals1-Calsarcin 1 (B).

Dabei zeigte sich, dass mit dem Titin A168-170 Antikörper gegen die Titinkinaseregion keine Färbung im KO auftrat (Abb. 3.5 A). Myomesin, dessen Bindungsstelle in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren deletiert wird, zeigte ebenfalls kein gestreiftes Muster mehr im KO (Abb. 3.5 B). Weiterhin wurde der Bereich hinter der Titinkinaseregion (M-Banden Exon 6) mit dem anti-M8/9 (Abb. 3.5 F, G, H) und der Bereich vor der Titinkinaseregion (A-Bande) mit dem Titin T3-Antikörper gefärbt (Abb. 3.5 A). Auch hier konnte keine Streifung im KO detektiert werden. Lediglich die I-Bande von Titin, die mit dem anti-N2B-Antikörper im Herzen gefärbt wurde und die Z-Scheibe, an die der anti-Tcap, anti-Calsarcin 1 und anti-Aktinin Antikörper banden, zeigten im KO ein normale gestreifte Färbung (Abb. 3.5 C, D, E).

Als Marker für das Zytoskelett des Muskels wurde die Lokalisation von Desmin und Tubulin mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Beide Proteine zeigten im WT ein alternierendes gestreiftes Muster mit dem anti-Titin M8/9, lokalisierten also an der Z-Scheibe. Im KO konnte diese Färbung sowohl im Herzen, als auch im Quadriceps nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.5 F, G).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen von Herz und Quadriceps deuten darauf hin, dass in den KO-Tieren die Sarkomerstruktur und das Zytoskelett durch die Deletion der Ttinkinaseregion stark beeinträchtigt wurden. Lediglich die Z-Scheibe und die I-Bande von Titin zeigten in den 20 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Tieren ein gestreiftes Muster, wohingegen die A- und M-Bande von Titin keine Färbung mehr aufwies. Da der Bereich von Titin hinter der deletierten Kinaseregion aber noch exprimiert und translatiert wird (Gotthardt et al., 2003), scheint das Protein ab der I-Bande nicht mehr richtig in das Sarkomer integriert zu werden (Abb. 3.5).


WT
KO
rot
grün
dual
rot
grün
dual
A
Q
H
10 µm
Titin T3
Titin A168-170
B
Q
H
Myomesin
Titin A168-170
C
Q
H
Aktinin
Tcap
D
H
Aktinin
N2B

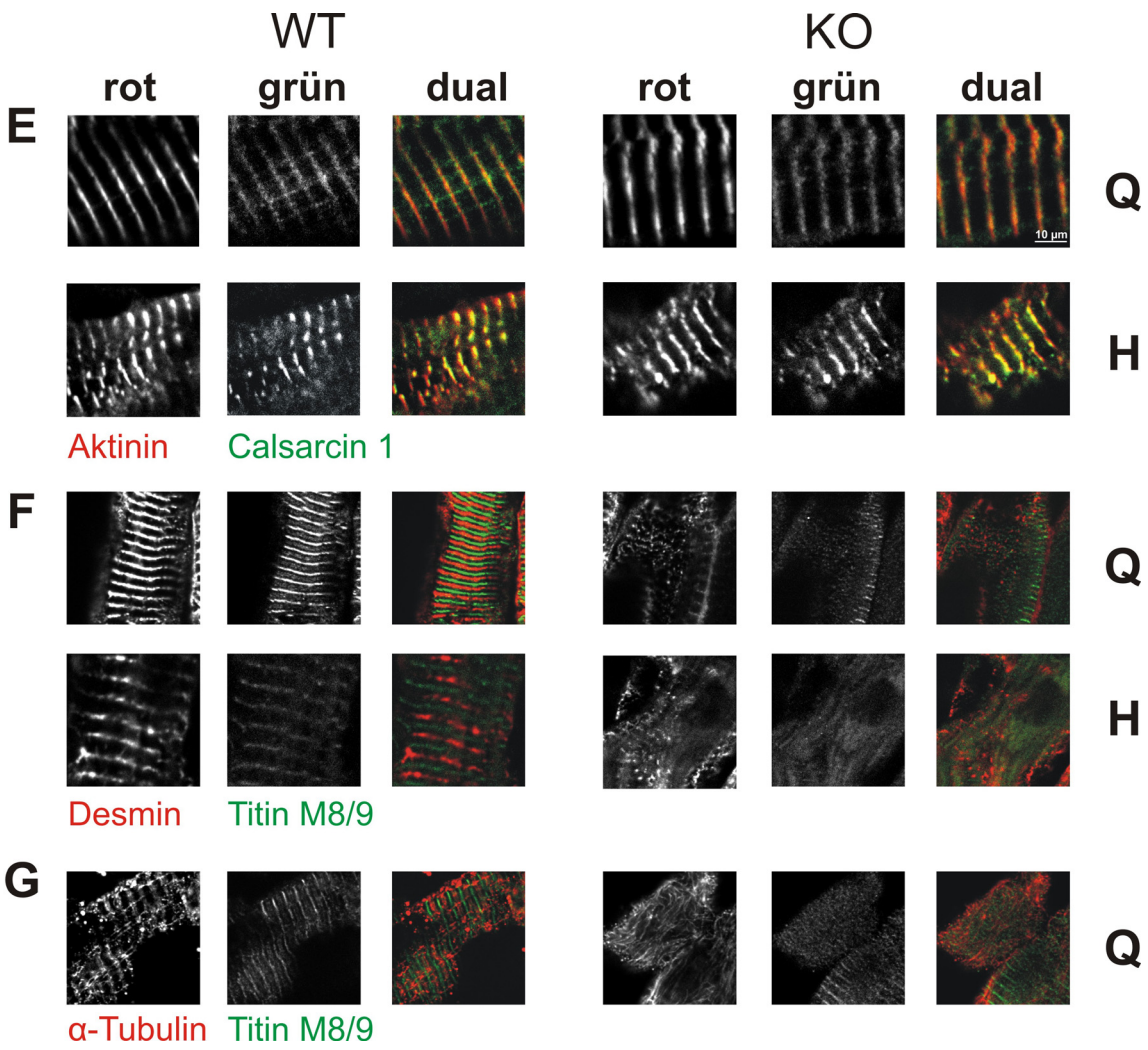


Abb. 3.5: Die Sarkomerintegration der M- und A-Bande von Titin ist in den Titinkinaseregion-KO-Tieren gestört

Die Immunfluoreszenzfärbungen von Herz- (H) und Quadricepsgewebe (Q) der 20 Tage alten Titinkinaseregion-defizienten Tiere zeigten, dass die M- und A-Bande von Titin keine gestreifte Färbung mehr im KO-aufwies (A, B), während die Z-Scheibe und I-Bande normal strukturiert waren (C, D, E). Außerdem konnte eine Mislokalisation der zytoskeletalen Proteine Tubulin und Desmin in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren beobachtet werden (F, G).

3.1.4 Erhöhte Synthese von Stress-induzierten Proteinen in den Titinkinaseregion-KO-Mäusen ab dem Tag 10

Um aufzuklären welche Proteine an der Ausbildung des Hypertrophie und Atrophie-Phänotyps der Titinkinaseregion-KO-Tiere beteiligt sind, wurde eine Proteomanalyse durchgeführt. Proteinlysate von Quadriceps und Herz von je vier Lox homozygoten Cre+

(KO) und 4 Lox homozygoten Cre- (WT) Tieren wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wurden sowohl männliche-, als auch weibliche Tiere verwendet, um nur die Geschlechts-unabhängigen Unterschiede zwischen WT und KO zu detektieren. Um einen möglichst breiten Einblick in die Veränderungen des Proteinstoffwechsels in Abhängigkeit zum Krankheitsverlauf zu bekommen, wurden jeweils drei unterschiedliche Zeitpunkte, 10, 20 und 30 Tage alte Tiere für die Quadricepsanalyse und 10, 20 und 34 Tage alte Tiere für die Herzanalyse, gewählt. Die 10 Tage alten KO-Tiere waren von den gleichaltrigen WT-Tieren phänotypisch nicht zu unterscheiden. In der Quadriceps-Proteomanalyse zeigten sich keine Unterschiede zwischen den 10 Tage alten WT- und KO-Tieren (Abb. 3.6 A), während im Herzen bereits das Hitzeschockprotein 25/27 (Genname HSPb1) im KO hochreguliert war (Abb. 3.6 B, Anhang Tab. 8.1). Hsp25/27 trat in zwei Proteinspots auf, die beide hochreguliert waren. Die Verschiebung des isoelektrischen Punktes in den sauren Bereich deutet auf eine Modifizierung des Proteins hin.

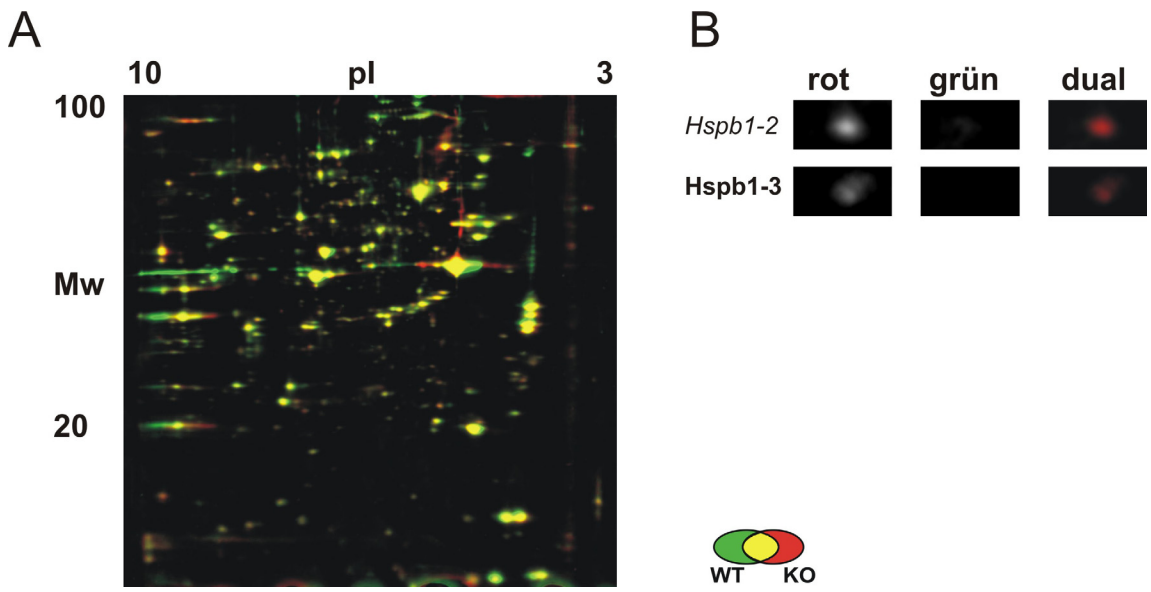


Abb. 3.6: Spezifische Akkumulation von Hspb1 im Herzen von 10 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Mäusen

(A) Wildtyp- und Knockoutgele wurden mit der Decodon-Software zu einem Dualbild übereinander gelegt, wobei die WT-Proteine grün und die KO-Proteine rot eingefärbt wurden. Gelbe Spots repräsentieren Proteine, die sowohl im WT als auch im KO in gleicher Menge vorhanden sind. Bei den 10 Tage alten Tieren waren im Quadriceps keine Proteine signifikant zwischen WT und KO verändert (A), während im Herzen das Hitzeschockprotein Hsp25/27 (Genname Hspb1) im KO akkumulierte (B). Es wurden zwei Hspb1-Spots detektiert, wobei die Verschiebung des isoelektrischen Punktes des einen Spots auf eine Modifizierung des Proteins zurückzuführen ist. Der kursiv gedruckte Proteinspot ist nicht signifikant verändert (P>0,1), trat aber zu späteren Analysezeitpunkten signifikant auf (n=4).

Die 20 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Tiere waren von der Größe und Verhalten von WT-Tieren nicht zu unterscheiden, zeigten aber bereits bei Kletterversuchen erste Anzeichen von Muskelschwäche. In der Quadriceps-Proteomanalyse konnten 37 unterschiedlich akkumulierte Proteine zwischen WT und KO detektiert werden. Davon waren nur ein Protein im KO in geringerer Menge als im WT vorhanden (Abb. 3.7, Anhang Tab. 8.4). Die größte Gruppe (54 %), der im KO akkumulierten Proteine, spielt bei der allgemeinen Stressantwort eine Rolle, wie z.B. Hitzeschockproteine oder Proteasombestandteile (Abb. 3.11). Außerdem wurden viele Sarkomerproteine (16 %) wie z.B Tubulin (Tuba1/2/7) und Desmin (Des), sowie metabolische Proteine (13,5 %) wie Aldehyddehydogenase 2 (Aldh2), Fatty acid binding protein 3 (Fabp3) und Phosphoglucomutase 2 (Pgm2) akkumuliert.

Im Gegensatz zum Quadricepsgewebe konnten im Herzen nur 9 unterschiedlich regulierte Proteine zwischen KO und WT detektiert werden (Abb. 3.8, Anhang Tab. 8.2). Davon wurde eines im KO vermindert synthetisiert. In Abhängigkeit von ihrer Funktion konnten sie in Stressproteine (78 %), wie z.B. Hsp25/27 (Hspb1) und Proteasomenuntereinheit α3 (Psma3), sowie metabolische Enzyme (22 %), wie z.B. Apolipoprotein A1 (ApoA1) (Abb. 3.11) eingeteilt werden. Im Gegensatz zum Quadriceps, wurden im Herzen zu diesem Zeitpunkt (20 d) keine Sarkomerproteine im KO akkumuliert. Vier Proteine, Hsp25/27 (Hspb1), cvHsp (Hspb7), αB-Crystallin (CryaB) und Proteasomenuntereinheit β4 (Psmb4) wurden sowohl im Herzen, als auch im Quadriceps der 20 Tage alten KO-Tiere vermehrt synthetisiert.

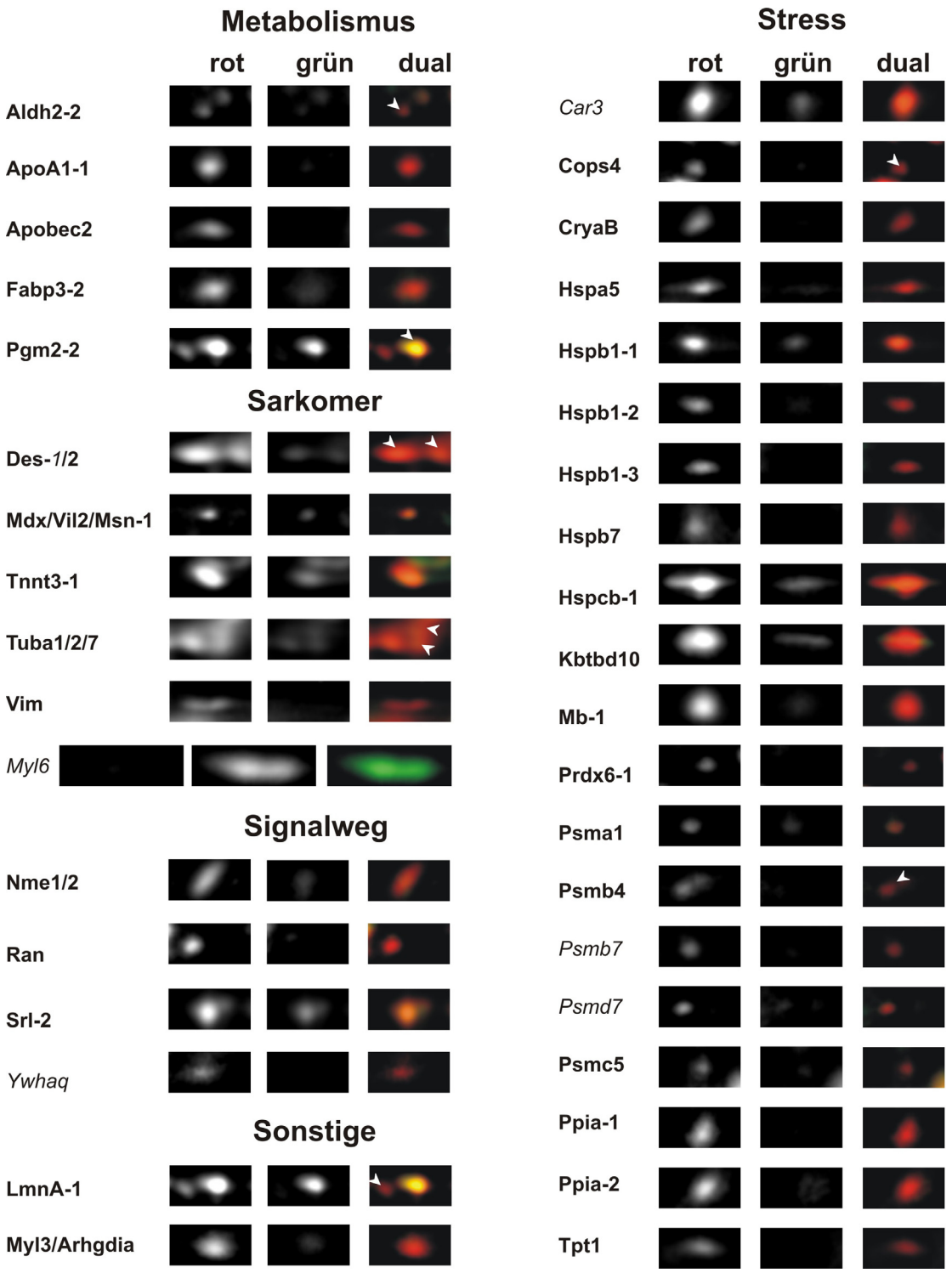


Abb. 3.7: Akkumulation von Sarkomer-, Stress- und metabolischen Proteinen im Quadricepsgewebe von 20 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Mäusen

Es wurden 37 Proteine gefunden, die im KO (rot) im Vergleich zum WT (grün) unterschiedlich synthetisiert wurden. Das Dualbild stellt die Überlagerung des WT und KO Gels dar und zeigt, ob das Protein im KO in höherer (rot) oder niedrigerer Menge (grün) auftrat. Die kursiv gedruckten Proteine sind nicht signifikant verändert (P>0,1), traten aber zu anderen Analysezeitpunkten erneut auf (n=4).

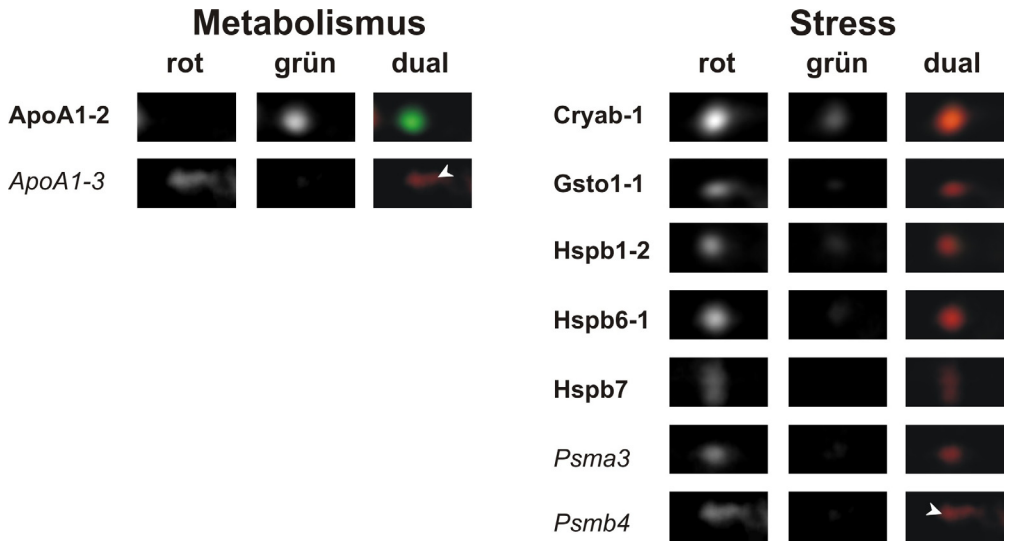


Abb. 3.8: Akkumulation von Stress- und metabolischen Proteinen im Herzgewebe von 20 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Mäusen

Es wurden 9 Proteine gefunden, die in den KO-Gelen (rot) im Vergleich zu den WT-Gelen (grün) unterschiedlich synthetisiert wurden (n=4).

Die 30 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Tiere waren kleiner als die Kontrolltiere und zeigten eine starke Muskelschwäche, so daß das Laufvermögen stark eingeschränkt war. Außerdem konnte eine Muskelschwäche der Augenlider beobachtet werden. In der Quadriceps-Proteomanalyse wurden für diesen Zeitpunkt 42 Proteine im KO, verglichen zum WT, akkumuliert (Abb. 3.9, Anhang Tab. 8.5). Nur ein Protein wurde im KO vermindert synthetisiert. Die prozentuale Verteilung der Proteine in Abhängigkeit ihre Funktion war ähnlich der Verteilung bei den 20 Tage alten Tiere. Dabei machten die Stressproteine mit 40 % wieder die größte Gruppe aus, während die Gruppe der metabolischen Enzyme und Signalproteine leicht zunahm (Abb. 3.11). Der Vergleich zwischen 20 und 30 Tagen alten Tieren zeigte, dass 26 Proteine zu beiden Zeitpunkten in veränderten Proteinmengen gegenüber dem WT auftraten.

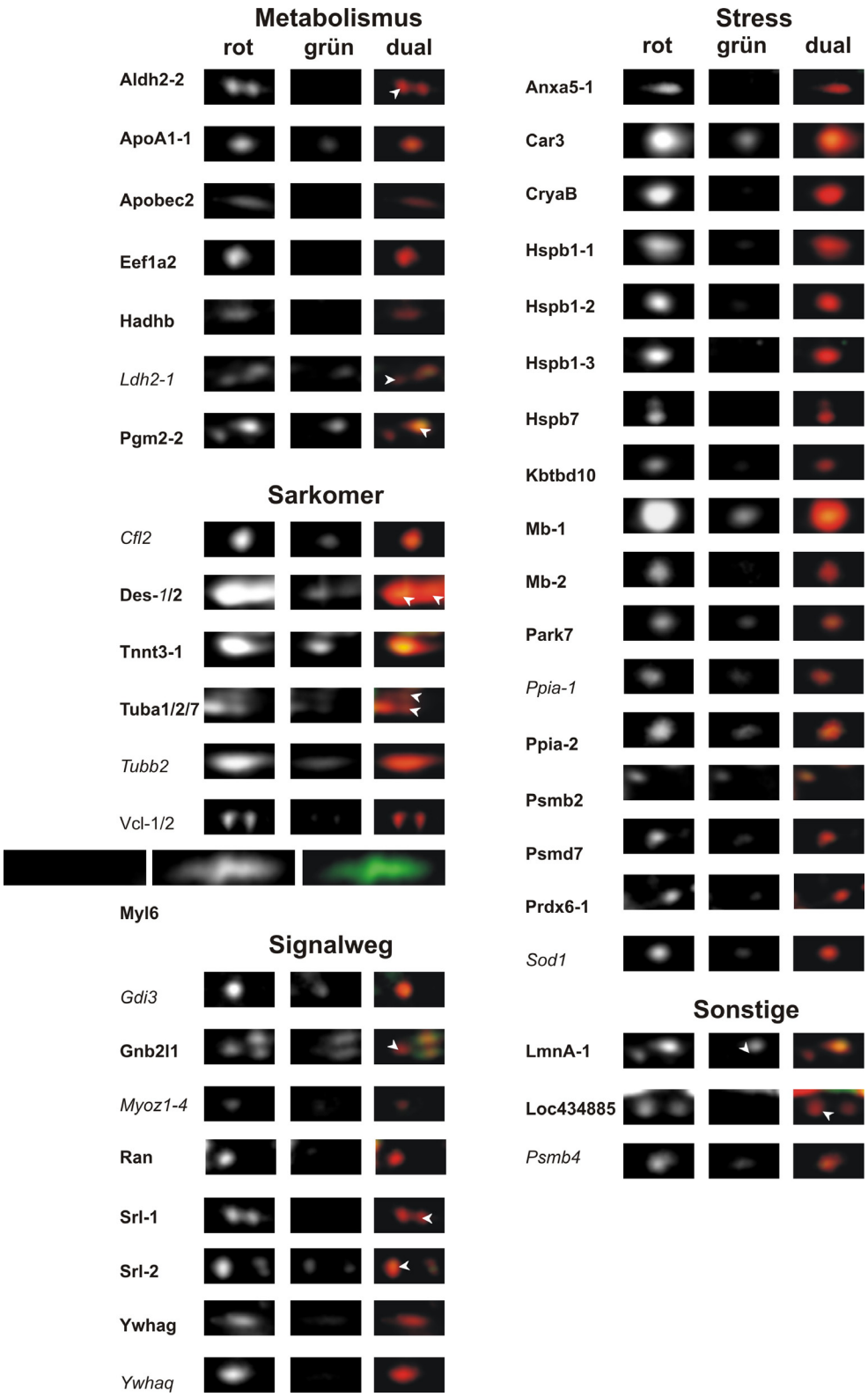


Abb. 3.9: Akkumulation von Sarkomer-, Stress- und metabolischen Proteinen im Quadricepsgewebe von 30 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Mäusen

Es wurden 42 Proteine gefunden, die in den KO-Gelen (rot) im Vergleich zu den WT-Gelen (grün) unterschiedlich synthetisiert wurden (n=4).

Die Herz-Proteomanalyse von 34 Tage alten Tieren zeigte einen starken Anstieg von 9 auf 24 unterschiedlich synthetisierten Proteinen zwischen WT und KO im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt (Abb. 3.10, Anhang Tab. 8.3). Alle Proteine wurden vermehrt synthetisiert. Die prozentuale Verteilung der Proteine gemäß ihrer Funktion war ähnlich wie bei der Quadricepsanalyse von 20 und 30 Tage alten Tieren (Abb. 3.11). Fünf Proteine wurden sowohl in den 20, als auch in den 30 Tage alten Tieren im Herzen vermehrt synthetisiert. Ein Vergleich der späten Zeitpunkte der Quadriceps- und Herzanalyse zeigte, daß der Großteil der unterschiedlich synthetisierten Proteine in beiden Geweben auftrat.

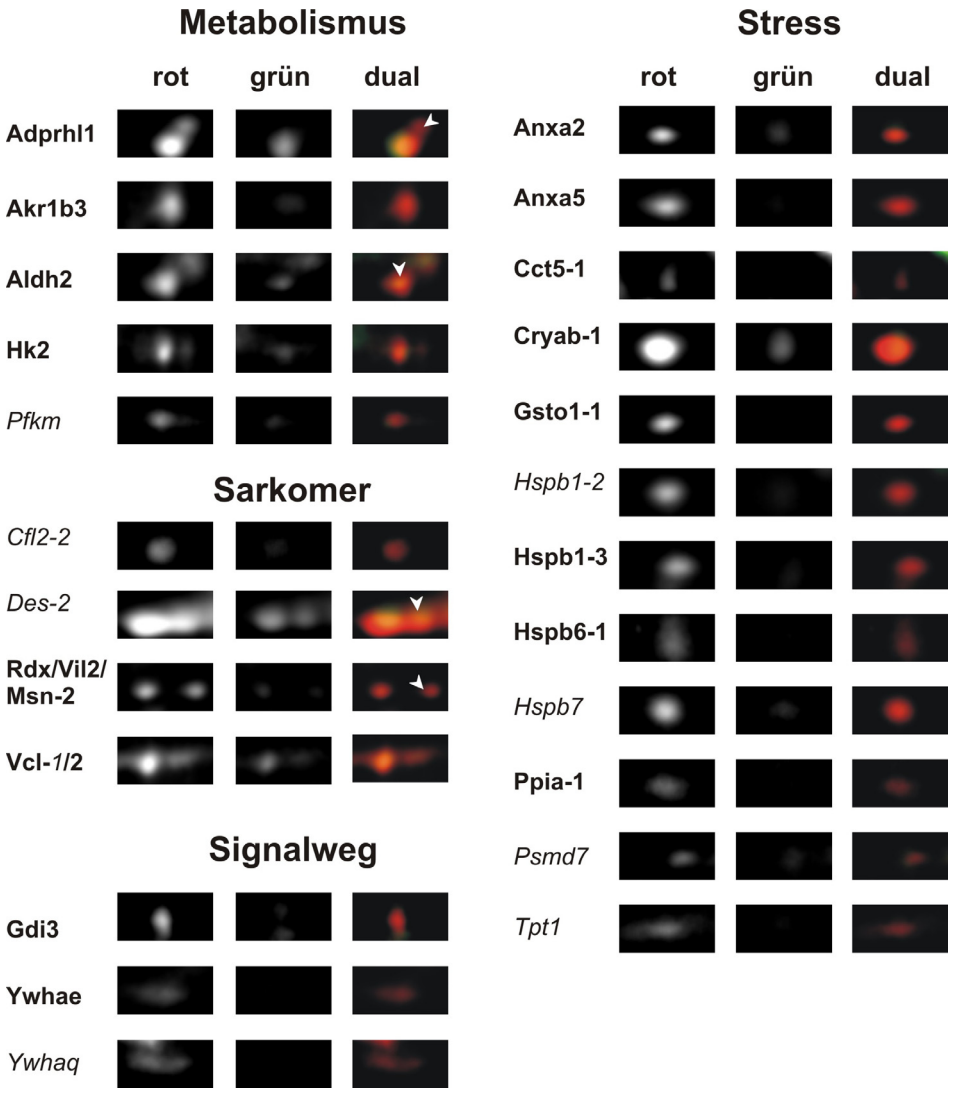


Abb. 3.10: Akkumulation von Sarkomer-, Stress- und metabolischen Proteinen im Herzgewebe von 34 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Mäusen

Es wurden 24 Proteine gefunden, die in den KO-Gelen (rot) im Vergleich zu den WT-Gelen (grün) unterschiedlich synthetisiert wurden (n=4).

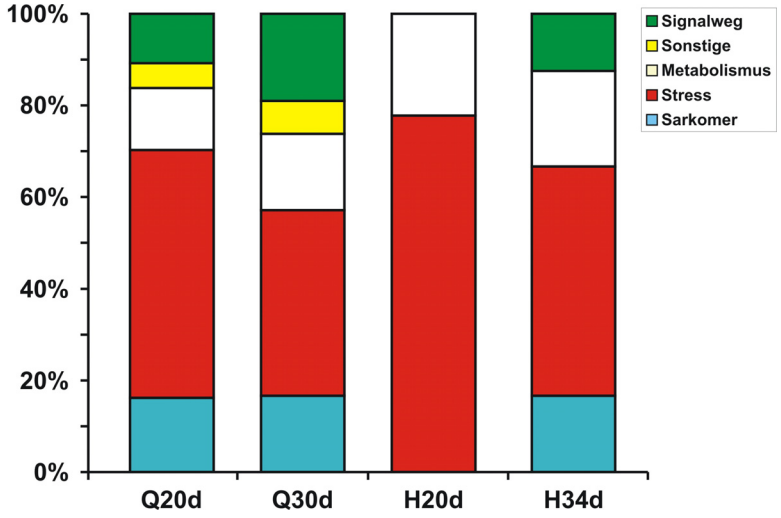


Abb. 3.11: Prozentuale Verteilung der unterschiedlich synthetisierten Proteine in Abhängigkeit ihrer Funktion aus den Proteomanalysen der Titinkinaseregion-KO-Tiere

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der unterschiedlich synthetisierten Proteine in Abhängigkeit ihrer Funktion aus der Quadriceps-Proteomanalyse von den 20 und 30 Tage alten Titinkinaseregion-KO- und WT--Mäusen (Q20d, Q30d) und der Herzanalyse von den 20 und 34 Tage alten Titinkinaseregion-KO- und WT-Mäusen (H20d, H34d) (n=4).

3.1.5 Der Verlust der Titinkinaseregion hat keine Auswirkung auf die Proteinmenge von M-Banden bindenden Proteinen

Die Deletion des M-Banden Exons 1 und 2 von Titin führt auch zur Deletion von Bindungsstellen für verschiedene Sarkomerproteine, wie Murf1 und FHL2, sowie Tcap und p62, beides Substrate der Titinkinase. Daher ist es möglich, dass der Phänotyp in den Titinkinaseregion-KO-Tieren durch veränderte Proteinmengen der M-Banden bindenden Proteine verursacht wird. Um das zu überprüfen wurden Western Blots Analysen von 20 Tage alten Titinkinaseregion-KO- und WT-Tieren durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass weder im Herzen noch im Quadriceps Unterschiede in der Proteinmenge von Myomesin, Murf1, p62 und FHL2 auftraten (Abb. 3.12). Tcap wurde nur im Quadriceps der KO-Tiere vermehrt synthetisiert, was auf Unterschiede in der Funktion von Tcap im Herzen und im Quadriceps hinweisen könnte. Außerdem wurde die Proteinmenge des Serum Response Factors (SRF) im Western Blot überprüft. Lange konnte zeigen, dass bei mechanischem Stillstand Murf2 durch die Substrate der Titinkinase Nbr1 und p62 nicht länger an die M-Bande gebunden wird, so dass es die Expression und Translokation von SRF verhindert (Lange et al., 2005). Es konnten aber keine Unterschiede in der Proteinmenge von SRF zwischen Titinkinaseregion-KO- und

WT-Tieren festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten die durch die 2D-Gelanalyse beobachtete Akkumulation von αB-Crystallin, Desmin und α-Tubulin im Western Blot bestätigt werden.

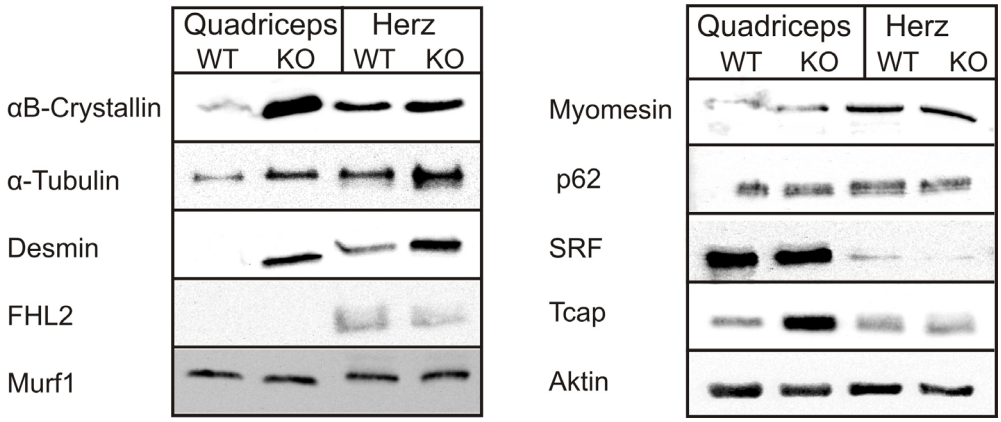


Abb. 3.12: Western Blot Analyse von Titin-assoziierten Proteinen

Die Western Blot Analyse von 20 Tage alten Titinkinaseregion-WT- und KO-Tieren zeigte eine vermehrte Synthese von αB-Crystallin, α-Tubulin und Desmin im Herz- und Quadricepsgewebe der Titinkinaseregion-KO-Tiere. Außerdem wurde Tcap im Quadriceps, aber nicht im Herzen der Titinkinaseregion-KO-Tiere akkumuliert. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet.

3.1.6 Oxidativer Stress in Titinkinaseregion-KO-Tieren

Die vermehrte Synthese von Myoglobin (Mb), Nukleosid-Diphosphatkinase 1 (Nme1) Superoxiddismutase 1 (Sod1) und Peroxiredoxin 6 (Prdx6) im Proteom der Titinkinaseregion-KO-Tiere weist auf erhöhten oxidativen Stress in diesen Tieren hin. Bei vermehrtem Auftreten von Sauerstoffradikalen oder verminderter Aktivität der Radikal-vernichtenden Enzyme kann es zu einer Schädigung der Proteine durch Oxidation der Thiolgruppen von Cysteinen kommen. Mit Hilfe eines 2D-Gel-basierten Fluoreszenzassays (Hochgrafe et al., 2005) sollte überprüft werden, ob in den 30 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Tieren Proteine mit Thiolmodifikationen auftreten. Dabei zeigte sich, dass bereits im WT im Quadriceps (A) und im Herzen (B) Proteine mit modifizierten Cysteinen (rot) auftreten (Abb. 3.13 A, B). Dabei handelt es sich entweder um Proteine mit intramolekularen Disulfidbrücken (Albumin) oder um Proteine, die während der enzymatischen Katalyse Disulfidbrücken ausbilden (Peroxiredoxin 2, 6) (Marchler-Bauer et al., 2005).

Im Vergleich von Titinkinaseregion-WT- und KO-Tieren trat im Quadriceps keine Zunahme von Proteinen mit oxidierten Cysteinen auf (Abb. 3.13 C). Im KO-Herz konnte ein Protein

mit einem starken Oxidationssignal detektiert werden, das im WT nicht auftrat (Abb. 3.13 D). Das Fehlen des Signals im Quadriceps deutet darauf hin, dass es sich um ein herzspezifisches Protein handeln muss oder andere Signalwege im Quadriceps und Herz eine Rolle spielen. Leider konnte dieses Protein mit dem geschätzten Mw von 16500 Da und dem pI von 5,3 aufgrund der geringen Proteinmenge bisher nicht identifiziert werden.

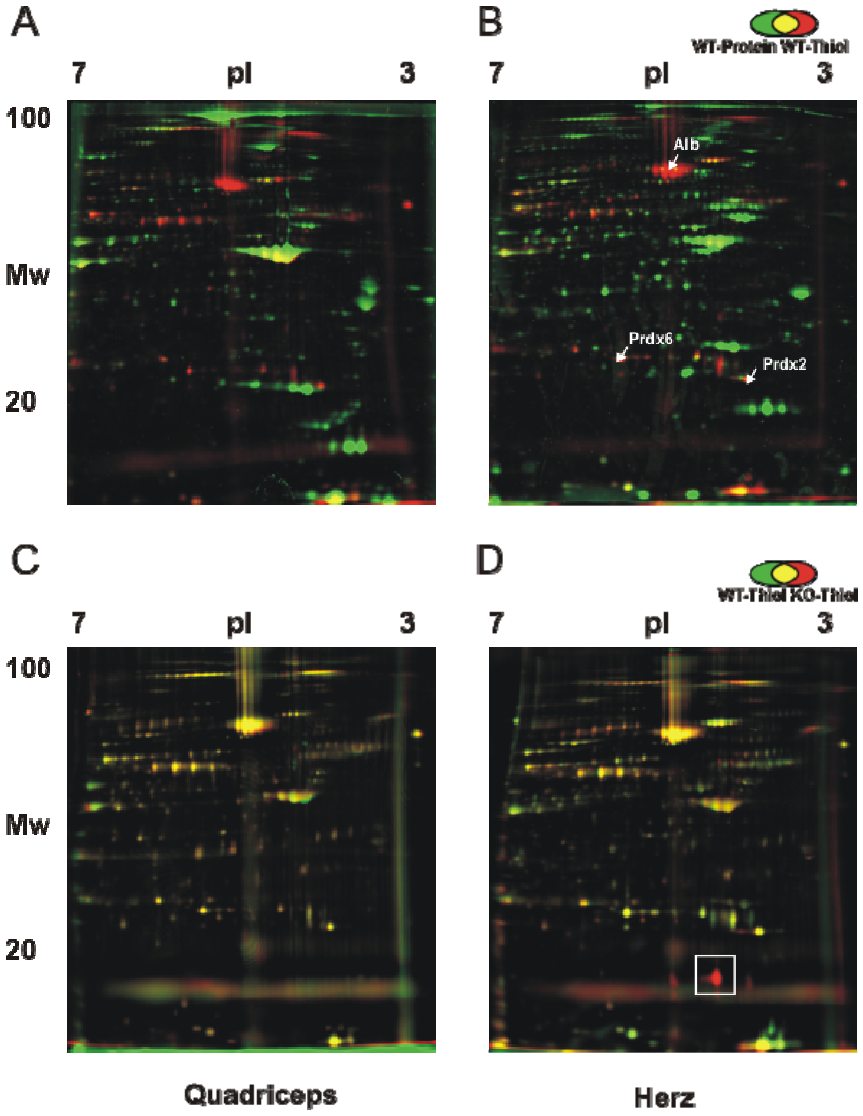


Abb. 3.13: Nachweis von Thiol-modifizierten Proteinen in Herz und Quadriceps der Titinkinaseregion-KO- und WT-Tiere Für die Analyse wurde Herz- und Quadricepsgewebe von 30 Tage alten Titinkinaseregion-WT und KO-Tieren aufgeschlossen, reversible Cysteinoxidationen spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und im 2D-Gel aufgetrennt. Nach der Detektion des Fluoreszenzssignals (rot) wurden die Gele mit Sypro Ruby gefärbt (grün) und übereinandergelegt. Dabei zeigte sich, dass bereits im WT-Quadriceps (A) und im WT-Herz (B) Proteine mit modifizierten Thiolen auftraten (rot). Beim Vergleich der Thiol-Fluoreszenzgele von WT und KO zeigte sich, dass im Quadriceps keine Unterschiede auftraten (C), während im KO-Herzen ein Protein ein starkes Oxidationssignal aufwies (D).

3.1.7 NFκB wird in den Titinkinaseregion-KO-Tieren nicht aktiviert

Die erhöhte Synthese der Superoxiddismutase 1 (Sod1), Peroxiredoxin 6 (Prdx6), Proteasomenbestandteile und verschiedener Hitzeschockproteine in den Titinkinasergion defizienten Tieren sowohl im Herz-, als auch im Quadricepsproteom deutete auf eine Stresssituation im Muskel hin. NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der durch verschiedene Arten von Stress, wie z.B. physischer Stress, oxidativer Stress und Chemikalien induziert wird. Enzyme, die den Redoxstatus der Zelle kontrollieren, wie die Superoxiddismutase 1 können die Aktivierung von NFκB verstärken (Zhou et al., 2001). Daher wurde mit einem Electrophoretic Mobility Shift Assay geprüft, ob eine Aktivierung von NFκB im Quadriceps oder Herz von 20 Tage alten KO-Tieren vorliegt. Als Positivkontrolle wurden Kardiomyozyten mit TNFα behandelt und nach 0,15 und 30 min geerntet. Es konnte aber weder im Herzen, noch im Quadriceps eine Aktivierung von NFκB in den KO-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 3.14).

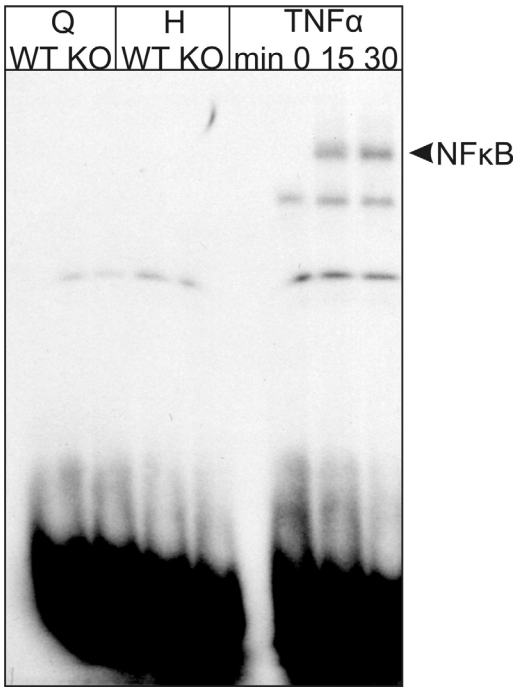
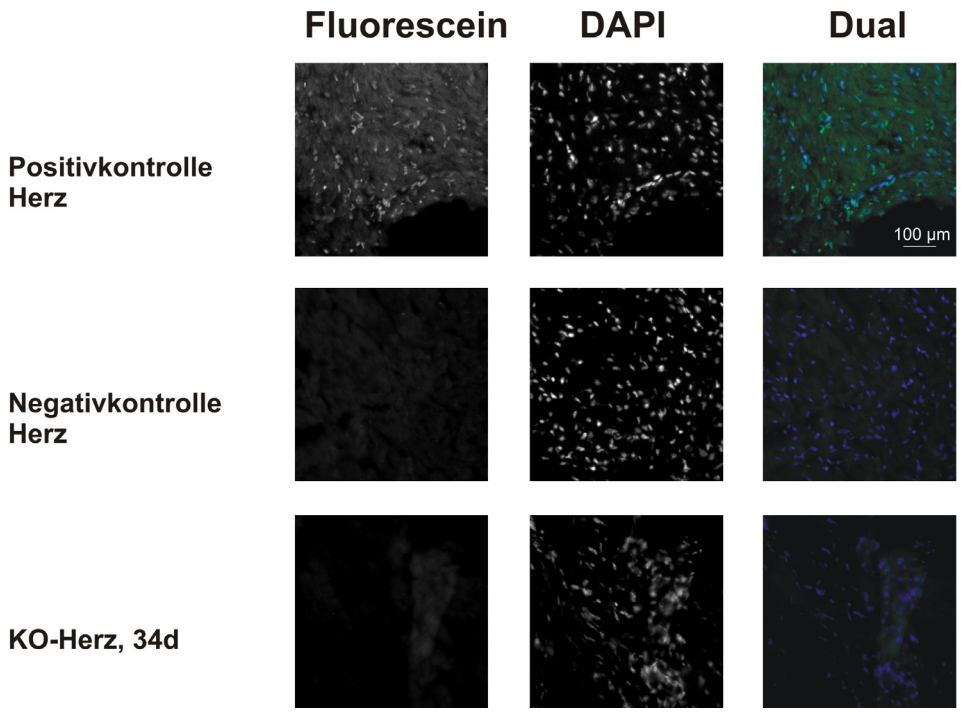


Abb. 3.14: Electrophoretic Mobility Shift Assay zum Nachweis von NFkB
Kernextrakte von Quadriceps- und Herzgewebe 20 Tage alter WT und KO-Tiere wurden mit einer radioaktiv-markierten Sonde gegen NFκB inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wurden Kardiomyozyten mit TNFalpha behandelt und 0, 15 und 30 min nach der Behandlung geerntet. Die Negativkontrolle (0 min) zeigte keine Aktivierung, während nach 15 und 30 min NFκB nachgewiesen werden konnten. Weder im Herzen, noch im Quadriceps von 20 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Tieren wurde NFkB aktiviert.

3.1.8 Deletion der Titinkinaseregion führt zur Apoptose im Quadriceps

Die vermehrte Synthese verschiedenener Untereinheiten des 26S-Proteasoms im Herz und Quadricepsproteom der Titinkinaseregion-KO-Tieren und die Muskelschwäche ließen auf eine Aktivierung proapoptotischer Signalwege in den Titinkinaseregion-KO-Tieren schließen.

Während der Apoptose werden Einzelstrangbrüche in die DNA durch eine Calcium-abhängige Endonuclease eingefügt, die zur Schädigung des Chromatins führen. Mit Hilfe des Cell Death Detection Kits von Roche sollten die bei der Apoptose auftretenden Einzelstrangbrüche in der DNA von 34 Tage (Herz) bzw. 30 Tage (Quadriceps) alten KO–Tieren nachgewiesen werden. Nach der Markierung mit Fluorescein, das an die DNA-Einzelstränge bindet, wurden die Schnitte mit DAPI, als Kernmarker, gefärbt. Dabei zeigte sich, dass in den Herzen der 34 Tage alten Titinkinaseregion-KO Tiere keine Apoptose auftrat, während in den 30 Tage alten Quadricepsproben der Titinkinaseregion-KO-Tiere DNA-Einzelstrangbrüche und somit eine fortschreitende Apoptose nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.15).



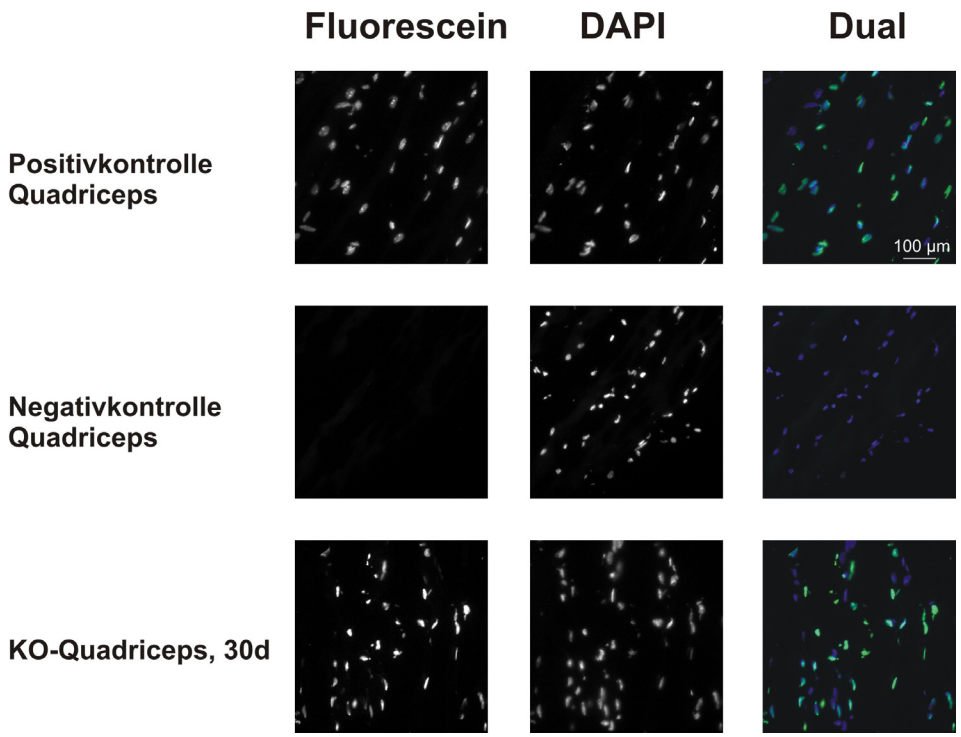


Abb. 3.15: Deletion der Titinkinaseregion führt zur Apoptose im Quadriceps, aber nicht im Herzen
Für den Apoptoseassay wurden Herz-Kryoschnitte von 34 Tage alten und Quadriceps-Kryoschnitte von 30 Tage alten WT- und KO-Tieren verwendet. Die Positivkontrollen wurde mit DNAse behandelt, um DNA-Einzelstrangbrüche zu induzieren, die Negativkontrollen wurde ohne terminale Transferase durchgeführt, so dass der Fluoreszenzmarker nicht binden konnte. Nach der Markierung mit Fluorescein (grün), wurden die Kryoschnitte mit DAPI (blau) als Kernmarker gefärbt. Dabei zeigte sich, dass im Quadriceps, jedoch nicht im Herzen DNA-Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden konnten.

3.2 Charakterisierung der M-Banden Region von Titin in induzierbaren herzspezifischen Titinkinase-KO-Mäusen

Da die bisher verwendeten Titinkinaseregion-KO-Tiere bereits mit 5 Wochen sterben, wurde ein induzierbares Titinkinaseregion-KO-Modell verwendet, um den Herzphänotyp in der adulten Maus genauer untersuchen zu können. Dazu wurden die Lox homozygoten Cre-negativen Tiere des Titinkinaseregion-KO-Stammes mit MerCreMer-positiven Mäusen verpaart. Die Mcm-Tiere enthalten ein Cre-Rekombinasegen, das unter der Kontrolle des herzspezifischen Myosin Heavy Chain (MHC)-Promotors steht und von zwei Sequenzen flankiert ist, die für Teile des Östrogenrezeptor codieren. Das MerCreMer-Fusionsprotein ist

unter normalen Bedingungen inaktiv. Die Injektion von Tamoxifen, einem Östrogen-Agonisten, führt zu einer Konformationsänderung des Fusionsproteins (Sohal et al., 2001), wodurch es in den Kern translokiert und die M-Banden Exons 1 und 2 von Titin deletiert. Der Vorteil dieses Modells ist, dass der KO zu jedem beliebigen Zeitpunkt induziert werden kann.

3.2.1 Deletion der Titinkinaseregion durch Tamoxifeninjektion

Um die Effizienz der Deletion des M-Banden Exons 1 und 2 von Titin zu testen, wurden Lox homozygote Cre- Tiere und Lox homozygote Cre+ Tiere mit 30 mg/kg Tamoxifen oder Lösungsmittel über 5 Tage oder 2 x 5 Tage behandelt. Die Herzen wurden 30 Tage nach der letzten Injektion entnommen, aufgeschlossen und im SDS-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei den Kontrolltieren, Cre- Tamoxifen-behandelt und Cre+ Lösungsmittel-behandelt, trat nur die WT-Titinbande auf (Abb. 3.16). Bei den KO-Tieren, Cre+ Tamoxifen-behandelt, war außerdem das um ca. 200 kDa verkürzte Titin unter der WT-Bande sichtbar. Etwa 50 % des Gesamt-Titins konnten 30 Tage nach 2 Injektionsrunden in der verkürzten, rekombinierten Form detektiert werden.

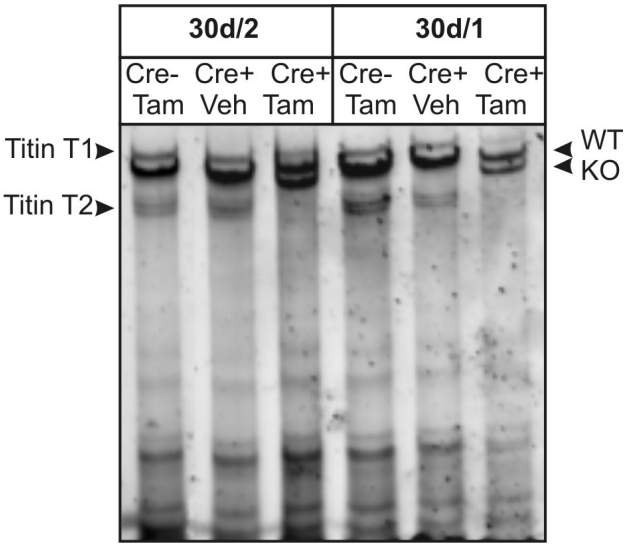


Abb. 3.16: SDS-Agarosegel zur Auftrennung von Titin Cre-negative (Cre-) und Cre-positive (Cre+) Tiere wurden mit Tamoxifen (Tam) oder Lösungsmittel (Veh) 1 Woche (30d/1) oder 2 Wochen (30d/2) i.p. injiziert. 30 Tage nach der letzten Injektion wurden die Herzlysate im SDS-Agarosegel aufgetrennt. In den Cre+ Tam-behandelten Tieren trat neben der WT-Titinbande das verkürzte Titin (KO) auf. Die Menge des verkürzten Titins war in den 2-fach (30d/2) injizierten KO-Tieren größer. Außerdem wurde die native Titinform (T1), sowie eine degradierte Form von Titin (T2) aufgetrennt.

3.2.2 Deletion der Titinkinaseregion führt zur kardialer Hypertrophie im induzierbaren Titinkinaseregion-KO

Die Herzen der Tamoxifen-behandelten Tiere zeigten 30 Tage nach 2 Injektionsrunden keine Unterschiede in der Größe im Vergleich zu den Lösungsmittel-behandelten Tieren, während man 65 Tage nach 2 Injektionsrunden eine deutliche Zunahme des Herzgewichts in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren gegenüber den Kontrolltieren beobachten konnte (Abb. 3.17). Außerdem wurde eine Vergrößerung der Lunge in den KO-Tieren festgestellt, was auf ein pulmonales Ödem, ausgelöst durch die Myophatie, hinweist. Die Deletion der Titinkinaseregion führt demnach zu einer Hypertrophie des Herzens, die wiederum eine Hypertrophie der Lunge bewirkt.

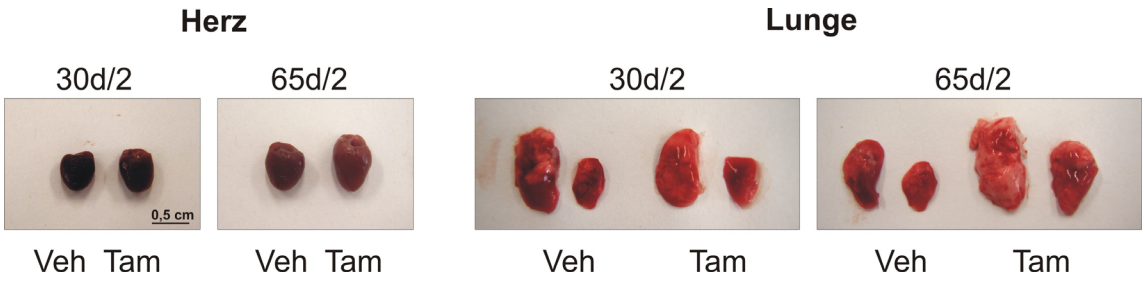


Abb. 3.17: Herz- und Lungenvergrößerung in den Titinkinaseregion defizienten Tieren
Dargestellt sind Herz und Lunge von Tamoxifen (Tam) behandelten Titinkinaseregion-KO- und Lösungsmittel- (Veh) behandelten Kontrolltieren 30 und 65 Tage nach zwei Injektionsrunden. Zum Zeitpunkt (30d/2) sind noch keine Unterschiede zwischen KO- und Kontrolle feststellbar, während Herz und Lunge 65 Tage nach 2 Injektionsrunden bei den Tamoxifen-behandelten Tieren stark vergrößert sind, was auf eine Myophatie mit anschließendem pulmonalen Ödem schließen läßt.

3.2.3 Reduzierte adrenerge Signaltransduktion in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren

Um mögliche Veränderungen in der Kontraktilität der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Herzen vor Ausbildung der Hypertrophie festzustellen, wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Henk Granzier (Pulman, USA), Versuche an isolierten Herzen durchgeführt. Dabei wurde ein aufblasbarer Latexballon und ein Mikromanometer, zur Druckmessung, in den linken Ventrikel von Lösungsmittel- und Tamoxifen- behandelten Herzen eingeführt. Durch Änderungen des Ballonvolumens kann der passive Druck auf das Herz erhöht werden.

Unter Einbeziehung des Herzgewichts wurde die Druck/Volumen Beziehung zum linksventrikulären Wandstress des Herzens umgewandelt, der die Kontraktilität des Herzens beschreibt. Es zeigte sich, dass nach adrenerger Stimulation mit dem β-Rezeptor Agonisten Dobutamin eine reduzierter Wandstress im linken Ventrikel der Titinkinaseregion-KO-Tieren ab 30 Tage nach 1 Injektionswoche T(30d/1) auftrat (Abb. 3.18 A). Dieser Effekt verstärkte sich nach 2 Injektionswochen T(30d/2) und längerer Retentionszeit T(80d/2) (Abb. 3.18 A). Bei Zugabe des β-Rezeptor Antagonisten Propanol, traten bis 80 Tage nach 2 Injektionsrunden T(80d/2) keine Unterschiede zwischen Lösungsmittel- und Tamoxifen-injizierten Herzen auf. Zum Zeitpunkt (80d/2) ist neben der reduzierten Dobutamin- und Propanolol-Signaltransduktion bereits die Kontraktilität der KO-Herzen unter Basalbedingungen erniedrigt, was wahrscheinlich auf die fortgeschrittene Kardiomyopathie in diesen Herzen zurückzuführen ist (Abb. 3.18 A).

Die reduzierte Kontraktilität der Tamoxifen-behandelten KO-Herzen zum Zeitpunkt (30d/1) und (30d/2) nach adrenerger Stimulation, könnte durch Veränderungen auf Ebene der Ca^{2+}-Signaltransduktion hervorgerufen werden. Um das zu prüfen wurden Lösungsmittel- und Tamoxifen-injizierte Herzen mit hohen Ca^{2+} Konzentrationen behandelt. In den Kontrolltieren führte der inotrope Effekt von Ca^{2+} zu einer erhöhten Kontraktilität des Herzens, während in den Tamoxifen-behandelten Herzen dieser Effekt nicht auftrat (Abb. 3.18 B). Das lässt auf eine veränderte Ca^{2+}-Signaltransduktion in den induzierbaren Titinkinaseregion-defizienten Tieren schließen.

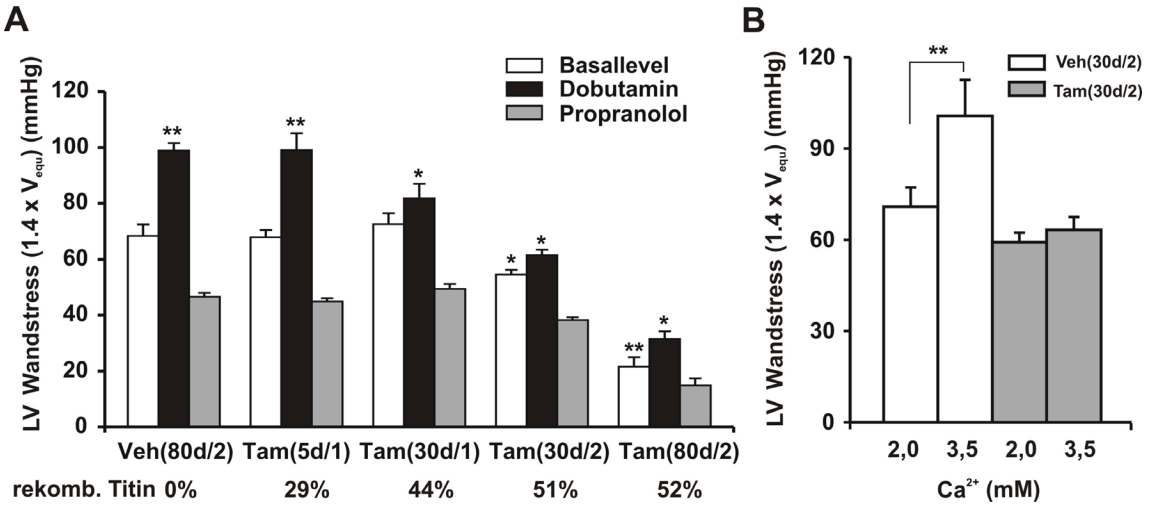


Abb. 3.18: Deletion der Titinkinaseregion führt zu einer reduzierten adrenergen Signaltransduktion

Für die Druck/Volumen Messungen am isolierten Herzen wurden Tamoxifen (Tam) behandelte Tiere 5 und 30 Tage nach einer Tamoxifen-Injektionsrunde, sowie 30 und 80 Tage nach 2 Injektionsrunden, verwendet. Als Kontrolle dienten Lösungsmittel- (Veh) injizierte Tiere zum Zeitpunkt (80d/2). Der linksventrikuläre Wandstress für jede Gruppe wurde jeweils unter Basalbedingungen (weiß), adrenerger Stimulation mit Dobutamin (schwarz) und adrenerger Blockierung mit Propanolol (grau) bestimmt (A). Nach Dobutaminbehandlung trat ein verminderter Wandstress im linken Ventrikel der Tamoxifen- behandelten Tiere ab dem Zeitpunkt T(30/1) auf. Unter Basalbedingungen und nach Propanololzugabe zeigten die Tamoxifen- behandelten Tiere, außer zum Zeitpunkt T(80d/2), keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Bei T(80/2) ist der Wandstress sowohl nach Dobutamin- und Propanololbehandlung, als auch unter Basalbedingungen vermindert (A) (n=6). Hohe extrazelluläre Ca^{2+} Konzentrationen (3,5 mM) verstärken die Kontraktilität der Lösungsmittel- (weiß), aber nicht der Tamoxifen-behandelten-Herzen (grau) zum Zeitpunkt (30d/2) (B) (n=5). **P<0,01 *P<0,05.

3.2.4 Die Integration der M- und A-Bande von Titin in das Sarkomer ist in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäusen gestört

Die reduzierte Signaltransduktion nach Dobutamingabe und bei hohen Ca^{2+}-Konzentrationen in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren könnte auch durch eine verminderte Kontraktilität des Sarkomers aufgrund von Strukturveränderungen verursacht werden. Um das zu prüfen, wurden Immunfluoreszenzstudien mit Antikörpern gegen Titin und Titin-bindende Proteine durchgeführt.

Die Färbung mit dem Titinkinase-Antikörper A168-170 auf Kryoschnitten von Tamoxifen-behandelten Tieren (30d/2) zeigte, dass einige Herzzellen gar keine Titinkinase mehr aufwiesen, während andere diese noch gut exprimierten (Abb. 3.19 A). Dabei betrug die Anzahl der Titin-defizienten Zellen etwa 30%. Zellen, die keine Kinasefärbung mehr

aufwiesen, zeigten auch keine Färbung mit dem Titin M8/9 Antikörper, der hinter dem deletierten Bereich an das M-Banden Exon 6 bindet (Abb. 3.19 E, F). Da dieser Bereich aber in den KO-Tieren noch normal exprimiert wird (Real Time PCR, 3.3.6, Abb. 3.22 A), scheint die Integration des verkürzten Titinmoleküls in das Sarkomer beeinträchtigt zu sein. Färbungen mit dem Titin T3 Antikörper, der vor der Titinkinaseregion an die A-Bande bindet, zeigten ebenfalls keine Streifung mehr in den KO-Zellen (Abb. 3.19 A), während die N2B-Region von Titin, die vor dem Titin T3 Antikörper liegt, normal strukturiert war (Abb. 3.19 B). Auch die Z-Scheibe, an die Calsarcin 1 (Abb. 3.19 C), Tcap (Abb. 3.19 D) und Aktinin (Abb. 3.19 B, C, D) binden, zeigte eine normale gestreifte Färbung in den KO- und Kontrolltieren.

Da Desmin und Myomesin bereits bei den Titinkinaseregion-KO-Tieren Unterschiede in der Lokalisation aufwiesen, wurden sie auch in den induzierbaren-KO-Mäusen überprüft. Dabei zeigte sich, dass auch in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren keine gestreifte Färbung mehr auftrat (Abb. 3.19 E, F).