

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Direktor: Prof. Dr. Walter Birchmeier

Titin M-line deficiency causes impaired myofibril maturation and cardiac dysfunction

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades
Doctor rerum medicarum der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Stefanie Weinert
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Michael Gotthardt

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D. Müller

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 22.09.2006

Contents

1	Introduction	1
1.1	The heart and cardiac muscle cells	1
1.1.1	Cardiac development in the mouse	1
1.1.2	Muscle cells	2
1.1.3	The Sarcomere	3
1.1.4	Contraction of muscle cells	4
1.2	Titin	5
1.2.1	Molecular structure	5
1.2.2	Titin isoforms	6
1.2.3	Functions of Titin	7
1.2.4	Non-muscle Titin	8
1.2.5	Interaction of Titin with structural and signaling proteins	8
1.3	Titin's M-line region and its integration into the M-band	9
1.3.1	Proteins of the M-band	10
1.3.2	Titin's kinase domain	12
1.4	Titin's implication in myofibrillogenesis	13
1.5	Titin knockout models and Titin's clinical relevance	15
1.5.1	Cell culture models	15
1.5.2	Animal models	16
1.5.3	Clinical relevance of Titin	17
1.5.4	The conditional Titin M-line exon 1 and 2 knockout mouse	18
2	Aim of the study	19
3	Materials and Methods	21
3.1	Materials	21
3.1.1	Chemicals and Enzymes	21
3.1.2	Solutions and Buffers	24

3.1.3	Media	25
3.1.4	Bacterial strain	25
3.1.5	Vectors	25
3.1.6	Antibodies	26
3.1.7	Kits	26
3.1.8	Software	27
3.2	Methods	28
3.2.1	Molecular Biology Methods	28
3.2.2	Microbiological Methods	34
3.2.3	Cellbiological Methods	34
3.2.4	Biochemical Methods	35
3.2.5	Animal Procedures	38
4	Results	43
4.1	Phenotype of the Titin M-line knockout model	44
4.1.1	Generating a constitutive mouse model	44
4.1.2	Titin antibodies, riboprobes, and amplicons	46
4.1.3	Knockout embryos expressed the truncated Titin protein	46
4.1.4	Expression of a truncated and a full length Titin transcript	47
4.1.5	Titin M-line deficiency caused impaired development	48
4.1.6	Knockout embryos were lethal by E11.5	51
4.1.7	Early cardiac morphogenesis was normal in knockout embryos	52
4.1.8	Expression of Titin isoforms in the heart was not affected	53
4.1.9	Titin has no essential non-muscle function	54
4.2	Molecular mechanism	55
4.2.1	Apoptosis as a consequence of cardiac dysfunction	56
4.2.2	Impaired sarcomere assembly in knockout embryos	57
4.2.3	Knockout Titin integrated into the I-band but not in the M-band	59
4.2.4	Localization of the M-band protein Myomesin	60
4.2.5	Sqstm1 localized to the I-band	62
4.2.6	Expression of Titin and its M-line binding proteins remained constantly low during embryogenesis	62
4.2.7	Expression of sarcomeric proteins and those involved in hyper- trophy did not lead to disassembly	64
4.3	Summary of results	66
5	Discussion	67
5.1	Knockout technology to understand Titin	67

5.2	Non-muscle functions of Titin and its M-line	68
5.3	Characterizing the severity of the phenotype	69
5.3.1	Apoptosis as an effect of cardiac dysfunction	70
5.4	Titin isoforms during embryogenesis	71
5.5	Titin in sarcomere assembly	72
5.5.1	Titin's M-line and Myomesin in myofibrillogenesis	74
5.6	Titin's M-line in signal transduction	75
5.6.1	Titin's kinase activity	75
5.6.2	Titin's kinase as a force sensor	76
5.6.3	Signaling molecules in sarcomere assembly and signaling	78
5.7	Atrophy and hypertrophy in knockout embryos	79
5.7.1	Atrophy regulated by MuRF-1	79
5.7.2	The MAPK pathway and hypertrophy	80
5.8	Future directions	82
6	Summary	85
7	Collaborators	89
8	Abbreviations	91
9	Zusammenfassung	93
	Bibliography	97

List of Figures

1.1	Schema of a skeletal muscle sarcomere	3
1.2	Domain structure of skeletal and cardiac muscle Titin	5
1.3	Titin's M-line region and localization of its interacting proteins	10
1.4	Model for maturation of myofibrils	14
4.1	Strategy to generate a constitutive mouse model	44
4.2	PCR analysis of a litter derived from a heterozygous mating	45
4.3	Location of antibodies, riboprobes, and amplicons	46
4.4	Titin protein expression in embryonic and adult hearts	47
4.5	<i>In situ</i> analysis of Titin gene expression	48
4.6	Development and histological analysis	49
4.7	Impaired development of the myocardium	50
4.8	Analysis of the cardiac contractility	51
4.9	Expression of Nkx2.5	52
4.10	Expression of Titin isoforms	53
4.11	Primary cells of knockout and wildtype embryos	55
4.12	Apoptosis assay	56
4.13	Ultrastructural analysis of cardiac sarcomere maturation	58
4.14	Integration of Titin and α -Actinin into the sarcomere	59
4.15	M-band assembly in the absence of Titin's M-line region	61
4.16	Expression of Titin binding proteins	61
4.17	Expression of Sqstm1	62
4.18	RNA and protein expression of Titin and sarcomeric proteins	63
4.19	Secondary changes in response to kinase region deficiency	65
5.1	Signaling and structural functions of Titin's M-line region	78

Publikationsliste

Sutton, B.S., **Weinert, S.**, Langefeld, C.D., Williams, A.H., Campbell, J.K., Saad, M.F., Haffner, S.M., Norris, J.M. and Bowden, D.W., Genetic analysis of adiponectin and obesity in Hispanic families: the IRAS Family Study. Hum Genet. 2005. 117(2-3):107-18.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden mit dem Einverständnis des Betreuers veröffentlicht:

Weinert, S., Bergmann, N., Luo, X., Erdmann, B. and Gotthardt, M., M-line deficient titin causes cardiac lethality through impaired maturation of the sarcomere J Cell Biol. 2006 May 22;173(4):559-70.

Poster und Vorträge

- | | | |
|---------|--|--|
| 06/2004 | Butterfly Seminar (MDC) | “Towards a functional understanding of Titin” (Vortrag) |
| 10/2005 | 7 th PhD Retreat (MDC) | “Functional Characterization of Titin’s M-line Region” (Vortrag) |
| 11/2005 | SFB Transregio 19 | “Impaired myofibril maturation in titin M-line deficient mice leads to embryonic lethality” (Poster) |
| 04/2006 | 5 th International Ascona Workshop on Cardiomyocyte Cell Biology (ETHZ) | “Impaired myofibril maturation in titin M-line deficient mice leads to embryonic lethality” (Poster + Präsentation) |

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Michael Gotthardt danken. Er legte nicht nur mit der Herstellung der konditionalen Titin Knockout-Tiere den Grundstein für diese Arbeit, sondern schuf auch optimale Arbeitsbedingungen und gewährte mir stets wissenschaftliche Freiheit.

Natürlich bedanke ich mich für die Unterstützung des gesamten "Gotthardt labs". Insbesondere bei Beate Goldbrich für das Pipettieren der einen oder anderen PCR, die auch beim 3. mal nicht klappen wollte. Weiterhin für ihre gewissenhafte Unterstützung bei den RNA Präparationen und RT-PCR Analysen. Katrin Räbel möchte ich danken für die Unterstützung bei den Genotypisierungen der Embryonen und den Immunfärbungen der "Schnittchen". Als es darum ging Embryonen zu präparieren und *in situ* Hybridisierungen durchzuführen, unterstützte mich Cathrin Rudolph. Katy Raddatz danke ich für die Einführung in das Aufschließen von Geweben und die Analyse von Proteinen. Vor allem aber für die angenehme und ruhige Atmosphäre im gemeinsamen Office. Michael Radke begleitete mich während der ersten Stunden in der Zellkultur und bei der "Pflege" von ES-Zellen. Allen anderen "Gotthardts", die ich nicht namentlich erwähnt habe, sei gedankt für die positive Atmosphäre, die bei aller Geschäftigkeit in den Laboren geherrscht hat.

Ebenso möchte ich mich bei den vielen Mitarbeitern des MDCs bedanken, die bei Fragen und Problemen mit guten Ratschlägen aushelfen konnten. Besonderer Dank gilt dabei Bettina Erdman und ihrer Arbeitsgruppe für die freundliche Kooperation und Unterstützung bei den Ultrastrukturanalysen. Hervorheben möchte ich auch die Arbeitsgruppe Willnow. Sie halfen nicht nur durch die Bereitstellung von so einigen Chemikalien und Geräten, sondern sorgten auch für gute und anregende Gespräche. Tilman Breiderhoff möchte ich danken für den in mir geweckten wissenschaftlichen Ehrgeiz, vielen hilfreichen Ratschlägen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Erklärung

“Ich, Stefanie Weinert, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: “Titin M-line deficiency causes impaired myofibril maturation and cardiac dysfunction” selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.”

Berlin, 2006