

9 Zusammenfassung

Deletion in Titins M-Linie führt zur Fehlfunktion des Herzens

Die kleinste kontraktile Einheit in der quergestreiften Herz- und Skelettmuskulatur ist das Sarkomer. Darin formen die Muskelproteine Actin, Myosin und Titin ein kontinuierliches Filamentsystem. Titin hat eine Größe von ca. 3 MDa und erstreckt sich im Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Bande. Es ist aus mehreren funktionellen Untereinheiten aufgebaut, die für den Aufbau, die Elastizität und die Funktion des Sarkomers von Bedeutung sind. Titins M-Linie enthält zahlreiche Bindungsstellen für Struktur- und Signalproteine und eine Kinase-Region. Diese wird vom M-Linien Exon 1 (MEx1) kodiert und ist an der Regulation von Muskelproteinen sowie an der Entstehung von neuen Myofibrillen beteiligt. Mit Hilfe von Mausmodellen und Zelllinien wurden die Funktionen verschiedener Regionen von Titin untersucht. Um die Rolle von Titins M-Linie in der frühen Embryonalentwicklung zu untersuchen wurde ein Mausmodell hergestellt, bei dem MEx1 und 2 konstitutiv ausgeschaltet ist. Dieses sollte zeigen, ob Titins M-Linie für den Aufbau von Sarkomeren oder für deren Funktionalität unabdingbar ist.

Heterozygote Tiere waren lebensfähig und fruchtbar, homozygote Knockout-Tiere wurden jedoch nicht geboren. Embryonalanalysen ergaben, daß sich Knockout-Embryonen bis E9.0 nach Befruchtung normal entwickelten. Sie wiesen eine normale Herzkontraktion auf und waren phänotypisch nicht von den Wildtypen zu unterscheiden. Ab E9.5 war die Entwicklung der Knockout-Embryonen jedoch gestört. Sie wiesen eine geringere Körpergröße und verminderte Somitenzahl auf sowie Anomalien des Herzens wie geringere Wandstärke des Myokards und reduzierte Trabekulierung der Ventrikel.

In Ultrastrukturanalysen von Herzmuskelzellen konnte gezeigt werden, daß bis E9.0 Myofibrillen mit dünnen und dicken Filamenten normal ausgebildet waren. Das laterale Wachstum der Myofibrillen war hingegen gestört. Die Auflösung der Myofibrillen in den Entwicklungsstadien E10.5 bis E11.5 führte zu einer reduzierten Pumpfunktion des Herzens und zum Tod der Knockout-Embryonen.

Der Aufbau der Sarkomere in den Knockout-Kardiomyozyten wurde durch Immunfärbungen verfolgt. Titins N-Terminus konnte in der I-Bande von Myofibrillen der E9.5 und E10.5

Knockout-Embryonen nachgewiesen werden. Titins C-Terminus hingegen wurde nicht in die M-Bande eingebaut, so daß kein kontinuierliches Filamentsystem ausgebildet werden konnte.

In der deletierten Region befinden sich Bindungsstellen für mehrere Struktur- und Signalproteine. Myomesin-EH ist ein Strukturprotein und unterstützt durch die Interaktion mit Titin und Myosin den Aufbau der M-Bande. Expressionsanalysen zeigten, daß Myomesin-EH im Wildtyp und Knockout gleich stark exprimiert wurde. Immunfärbungen zeigten, daß Myomesin unabhängig von Titins M-Linie in der M-Bande lokalisierte. Das im Vergleich zum Wildtyp diffuse Signal kann mit Myomesins fehlender Bindungsstelle an Titin erklärt werden. Die fehlende Verankerung des Titin-Myomesin Bindungskomplexes in der M-Bande könnte zu einer unstablen M-Banden Struktur sowie einer erhöhten Mobilität der Filamente geführt haben. Zunehmende mechanische Belastung könnte daraufhin den Zerfall der Myofibrillen ausgelöst haben.

Nbr1, Sqstm1 und T-cap sind *in vitro* Substrate der Titin-Kinase. Es wurde gezeigt, daß diese Proteine an der Regulierung von Muskelproteinexpression und der Myofibrillogenese beteiligt sind. Die vorliegende Studie zeigte, daß Nbr1, Sqstm1 und T-cap gleichermaßen gering im Wildtyp wie im Knockout exprimiert waren. Dies läßt vermuten, daß die Substrate eine sekundäre Rolle in der Entwicklung von Herzmuskelzellen spielen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, daß die Aktivierung der Titin-Kinase und die Phosphorylierung von T-cap nicht das regulierende Prinzip des Aufbaus vom Sarkomer sind.

Zwei weitere mit Titin interagierende Proteine sind die Ubiquitin-Ligasen MuRF-1 und MuRF-2. Diese haben sowohl Adaptor- wie auch Signalfunktionen und verknüpfen dadurch die Architektur des Zytoskeletts mit der Regulation von Muskelproteinexpression. Die Expression von MuRF-1 ist bei Atrophie der Skelettmuskulatur erhöht. Ein Merkmal des kardialen Phänotyps der Knockout-Embryonen war die Atrophie der Herzmuskulatur. Eine erhöhte Expression von MuRF-1 zu diesem Zeitpunkt konnte aber nicht gemessen werden. Auch MuRF-2 war in den Knockout-Embryonen unverändert exprimiert. Die Funktion von MuRF-1 und MuRF-2 im Herzen ist weitgehend ungeklärt, aber ihre Expression in der frühen Entwicklung weist auf eine primäre Rolle in der frühen Entwicklung von Kardiomyozyten hin.

Erkrankungen des Herzmuskels werden als Kardiomyopathien bezeichnet. In hypertrophen Herzen ist der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP) Signalweg aktiviert. Im konditionalen Knockout waren mehrere Proteine des MAP-Signalweges verstärkt exprimiert. Die Expression war jedoch in den konstitutiven Knockout-Embryonen unverändert.

Titin wurde nicht nur in der quergestreiften Muskulatur sondern auch in Nichtmuskelzellen, wie in den Epithelzellen von Darmwänden, nachgewiesen. In anderen Studien wurde Titin im Spindelapparat nachgewiesen und eine Rolle bei der Zellteilung postuliert. Isolierte Zellen der Knockout-Embryonen wiesen jedoch keine generelle Störung der Zellteilung oder in der Differenzierung auf. Dies wurde auch durch die normale Entwicklung von Geweben

und Organen der Embryonen bis E9.5 bestätigt.

Weder die Untersuchungen an Zebrafischen und Mausmodellen noch Zellkultur-Experimente konnten bisher die Funktion von Titins M-Linie in der frühen Entwicklung von Herzmuskelzellen vollständig aufklären. Die Analyse der Knockout-Embryonen hat jedoch gezeigt, daß Titins Kinase-Domäne und Titin bindende Struktur- und Signalproteine für die Entstehung reifer Myofibrillen unabdingbar sind. Dieses Knockout-Modell trägt zum Verständnis der Pathophysiologie und der molekularen Mechanismen von Kardiomyopathien bei und könnte somit die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für kardiovaskuläre Erkrankungen fördern.

