

Diese Arbeit ist denen gewidmet,  
die mir voran gingen,  
die an meiner Seite stehen  
und denen, die mir folgen werden.

# **Molekulare und funktionale Analyse der elastischen Eigenschaften von Titin**

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

Michael H. Radke  
aus Berlin

November 2006

1. Gutachter : Prof. Gotthardt

2. Gutachter : Prof. Rathjen

Disputation am 22.Dezember 2006

## **Danksagung:**

Bei Herrn Professor Gotthardt möchte ich mich nicht nur für die freundliche Aufnahme in seinem Labor, die Hilfestellung bei der Bearbeitung des Themas, die gute Betreuung und Zusammenarbeit bedanken, sondern auch für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, um dieses Projekt zu bearbeiten. Seine konstruktive Kritik, Ermunterung und stets gewährte Unterstützung trugen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Rathjen danke ich für Bereitschaft das 2. Gutachten zu erstellen und für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Gotthardt möchte ich mich für die stets freundliche und kooperative Zusammenarbeit und die Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen, sowie für die großen und kleinen Hilfestellungen im Labor bedanken.

Mein besonderer Dank gilt hier unserer Technischen Assistentin Beate Goldbrich die durch ihren unermüdlichen Einsatz sowohl bei der Genotypisierung als auch bei Klonierungen, PCRs, Southernblots und vielen weiteren Arbeiten im Labor wesentlich zum Gelingen der Experimente beigetragen hat. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Katy Raddatz für die Hilfe bei allen Proteinbiochemischen Fragen und bei Stefanie Weinert für die Hilfe bei Fragen zur Immunhistochemie und Mikroskopie. Auch bei unseren TA-Schülerinnen Katrin Räbel und Cathrin Rudolph möchte ich mich für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenz-Färbung bedanken.

Ich möchte mich weiterhin bei Prof. Granzier und seiner Arbeitsgruppe bedanken, der mich während meines Forschungsaufenthalts in Pullman, Washington aufnahm und unterstützte. Mein besonderer Dank gilt hier Dr. Jun Peng für die Unterstützung bei den Versuchen am isolierten Herzen, Yiming Wu für die Durchführung der Experimente zur Muskelfasermessung, Xiuju Luo für die RNA Chipanalyse und Mark McNabb für die elektronenmikroskopischen Analysen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Lynne Nelson für die exzellente Unterstützung bei den echokardiographischen Untersuchungen bedanken.

Auch bei der Arbeitsgruppe Morano und besonders bei Dr. Karczewski bedanke ich mich für die Bereitstellung der Ausrüstung zur Vermessung und Analyse der Kardiomyozyten.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe Willnow für die zur Verfügungstellung der ES-Zellen, sowie die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei Zellkulturexperimenten und der Möglichkeit der Mitbenutzung der Laborgerätschaften. Mein besonderer Dank hier an Dr. Helle Petersen und Dr. Tilmann Breiderhoff für die Einführung in die Geheimnisse der ES-Zellkultur. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Susanne Schütz und Katja Becker für die Injektion ES Zellen.

**Vielen Dank**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1-1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>2-3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3-5</b>
3.1	Das Herz.....	3-6
3.2	Das Sarkomer.....	3-7
3.3	Titin.....	3-9
3.3.1	<i>Das Titin Filamentsystem.....</i>	<i>3-9</i>
3.3.2	<i>Titins elastische Elemente.....</i>	<i>3-11</i>
3.3.3	<i>Titins Bindungspartner.....</i>	<i>3-13</i>
3.3.4	<i>Titin bei Herzkrankheiten.....</i>	<i>3-15</i>
3.4	Knockout Technologie.....	3-16
3.5	Ziele der Arbeit.....	3-19
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>4-21</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden:.....	4-21
4.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	<i>4-21</i>
4.1.2	<i>Lösungen.....</i>	<i>4-21</i>
4.1.3	<i>Bakterien-Stamm.....</i>	<i>4-21</i>
4.1.4	<i>Geräte.....</i>	<i>4-21</i>
4.1.5	<i>Kits.....</i>	<i>4-22</i>
4.1.6	<i>Plasmide.....</i>	<i>4-22</i>
4.1.7	<i>Enzyme.....</i>	<i>4-23</i>
4.1.8	<i>DNA Präparation.....</i>	<i>4-23</i>
4.1.9	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....</i>	<i>4-24</i>
4.1.10	<i>Real Time RT-PCR (TaqMan).....</i>	<i>4-27</i>
4.1.11	<i>Gelelektrophorese.....</i>	<i>4-28</i>
4.1.12	<i>Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....</i>	<i>4-29</i>
4.1.13	<i>Klonierung von DNA Fragmenten und Vektoren.....</i>	<i>4-30</i>
4.1.14	<i>Generierung der Targeting-Vektoren.....</i>	<i>4-30</i>
4.1.15	<i>Sequenzierung.....</i>	<i>4-31</i>

4.1.16	<i>Southernblot mit genomischer DNA</i> .....	4-32
4.1.17	<i>Proteinpräparation</i> .....	4-32
4.1.18	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i> .....	4-33
4.1.19	<i>Antikörper</i> .....	4-34
4.1.20	<i>Westernblot</i> .....	4-35
4.1.21	<i>Präparation von Herzen für Histologische Untersuchungen</i> .....	4-35
4.1.22	<i>H&amp;E Färbung an Parafinschnitten des Herzens</i> .....	4-36
4.1.23	<i>Azan novum Färbung an Parafinschnitten des Herzens</i> .....	4-36
4.1.24	<i>Immunfluoreszenz</i> .....	4-36
4.2	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	4-37
4.2.1	<i>Zellkultur Geräte</i> .....	4-38
4.2.2	<i>Zellen</i> .....	4-38
4.2.3	<i>Material für die Zellkultur</i> .....	4-38
4.2.4	<i>Zellkultur Medien, Lösungen und Chemikalien</i> .....	4-39
4.2.5	<i>Beschichtung von Zellkulturschalen mit Gelatine</i> .....	4-40
4.2.6	<i>Erzeugung primärer Fibroblasten</i> .....	4-40
4.2.7	<i>Kultivieren / Passagieren von Zelllinien</i> .....	4-40
4.2.8	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i> .....	4-41
4.2.9	<i>Inaktivieren von Fibroblasten</i> .....	4-41
4.2.10	<i>ES-Zell-Targeting</i> .....	4-41
4.2.11	<i>Isolation adulter Kardiomyozyten</i> .....	4-43
4.2.12	<i>Kontraktionsmessung der Kardiomyozyten</i> .....	4-44
4.3	<b>Funktionelle Studien</b> .....	4-44
4.3.1	<i>Haltung und Verpaarung der Versuchstiere</i> .....	4-44
4.3.2	<i>Isoliertes arbeitendes Herz nach Langendorf</i> .....	4-44
4.3.3	<i>Echokardiographie</i> .....	4-46
4.3.4	<i>Induktion von Hypertrophie durch adrenerge Stimulation</i> .....	4-46
4.4	<b>Auswertung der Daten und Statistische Analyse</b> .....	4-46
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>5-48</b>
5.1	<b>Klonierung der Targeting Vektoren und Rekombination der N2B und PEVK-Region</b> .....	<b>5-48</b>
5.1.1	<i>N2B Targeting</i> .....	5-48
5.1.2	<i>PEVK Targeting</i> .....	5-50

5.2	Erzeugung N2B- und PEVK- defizienter Mäuse .....	5-52
	<i>Überprüfung der N2B bzw. PEVK Defizienz auf genomischer Ebene</i> .....	5-53
5.3	Analyse der N2B- bzw. der PEVK- defizienten Tiere .....	5-54
5.3.1	<i>Expressionsanalyse der mutierten Titin RNA-Transcripte</i> .....	5-54
5.3.2	<i>Analyse der mutierten Titinproteine</i> .....	5-56
5.3.3	<i>Phänotypische Analyse der N2B- und PEVK-defizienten Tiere</i> .....	5-59
5.3.4	<i>Analyse von Funktion und kontraktile Eigenschaften des Herzens</i> .....	5-66
5.3.5	<i>Einfluss der Deletionen auf Bindungspartner von Titin in der I-Bande</i> .....	5-74
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	5-80
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>6-82</b>
6.1	Generierung der N2B- und PEVK-Knockout-Modelle.....	6-82
6.2	Der Aufbau der Sarkomere in N2B- und PEVK-defizienten Tieren ist nicht beeinträchtigt.....	6-83
6.3	Erhöhte passive Steifheit und diastolische Dysfunktion in N2B-und PEVK- defizienten Tieren.....	6-84
6.4	Die kontraktile Funktion ist in N2B defizienten Kardiomyozyten erniedrigt, in PEVK defizienten Zellen erhöht .....	6-86
6.5	Die I-Bande als Schnittstelle zwischen Signaltransduktion und Biomechanik.....	6-88
6.6	Weiterführende Studien.....	6-92
6.7	Abschließende Bewertung der Ergebnisse .....	6-94
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>7-95</b>
7.1	Verzeichnis der Tabellen.....	7-95
7.2	Verzeichnis der Abbildungen.....	7-95
7.3	Verzeichnis der Abkürzungen.....	7-96
<b>8</b>	<b>Verzeichnis der erfolgten Publikationen.....</b>	<b>8-98</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis: .....</b>	<b>9-98</b>