

5 Ergebnisse

Die N2B und die PEVK-Region sind die beiden Federelemente des Titinproteins und somit für die passive Steifheit des Muskels mit verantwortlich. Die N2B-Region beeinflusst über FHL2 zusätzlich Signaltransduktion und Stoffwechsel.

Durch Deletion dieser Domänen sollte untersucht werden, ob und wie sich der Verlust dieser Bereiche auf die Entwicklung des Herzens, die Mechanik des Sarkomers und der Muskelfasern sowie die Pumpfunktion des Herzens auswirkt. Des Weiteren soll der Einfluss der Deletion auf Titin-Bindeproteine im Bereich der I-Bande untersucht werden, um einen besseren Einblick in Titin abhängige Signalgenerierung zu erhalten.

5.1 Klonierung der Targeting Vektoren und Rekombination der N2B und PEVK-Region

5.1.1 N2B Targeting

Ziel bei der Generierung des N2B Targeting-Vektors war es, das Exon 49 von Titin zu deletieren, ohne den Leserahmen von Titin zu zerstören.

Targetvektor

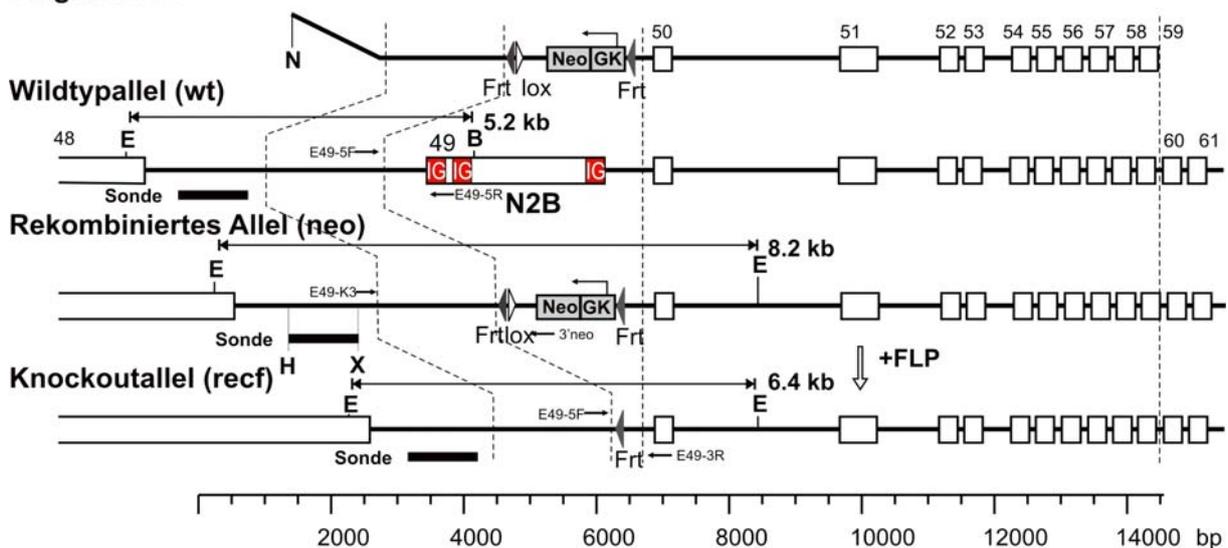


Abbildung 9: Targeting Strategie für den N2B Knockout. Das Exon 49, das für die N2B-Region und drei Immunglobulin Domänen kodiert, wird im Targeting-Vektor durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt. Durch Rekombination mittels der FLP-Rekombinase wird die Neomycinresistenzkassette ausgeschnitten, so dass nur noch eine Frt-Schnittstelle im

Knockoutallel zurückbleibt. Die Bindungsstellen der Genotypisierungsprimer sind als Pfeile, die Bindungsstelle der Southernblot-Sonde als schwarze Box dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen für den Southernblot sind *EcoRI* (E) und *BamHI* (B). Der Targeting-Vektor wurde mit *NotI* (N) linearisiert.

Exon 49 codiert die unikale N2B Sequenz und zusätzlich drei Immunglobulin Domänen I24, I25 und I26. Im Targeting-Vektor wird dieses Exon durch die Neomycinresistenzkassette ersetzt, welche von Frt-Sequenzelementen flankiert wird. Diese werden von der FLP-Rekombinase erkannt und rekombiniert, so dass die Neomycinresistenzkassette aus dem Genom entfernt wird und den Phänotyp nicht beeinflussen kann (Abbildung 9). Zurück bleibt das deletierte Allel in dem nur die N2B-Region fehlt, der Leserahmen aber erhalten bleibt.

Ein Restriktionsverdau des N2B Targeting-Vektors mit *EcoRI* / *HindIII*, sowie mit *XbaI* zeigt, dass die klonierten Fragmente die richtige Orientierungen besaßen und den Vorhersagen bezüglich ihrer Größe entsprachen (Abbildung 10 A, B). Der Aufbau des N2B Targeting-Vektors entsprach den Erwartungen.

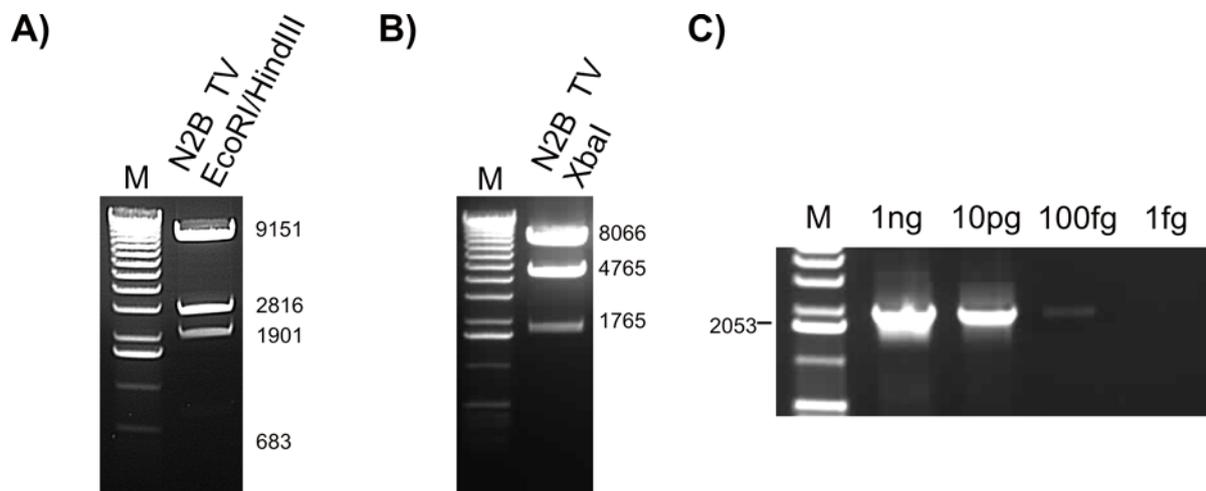


Abbildung 10: Restriktionsanalyse des N2B Targeting-Vektors und Ermittlung der Sensitivität der N2B Rekombinations-PCR. A) Restriktionsanalyse des N2B Targeting-Vektors im Doppelverdau mit *EcoRI* und *HindIII*, sowie B) im Verdau mit *XbaI*. Die erwarteten Fragmentgrößen liegen bei dem *EcoRI* / *HindIII* Verdau bei: 9151, 2816, 1901 und 683 bp; bei dem *XbaI* Verdau bei: 8066, 4720 und 1765 bp. C) Die Sensitivität der N2B Rekombinations-PCR wurde mit Verdünnungen des Kontrollplasmids von 1 ng -1 fg bestimmt. Das erwartete PCR Produkt hat bei Verwendung der Primer „MR N2B K3“ und „3'neoflox“ eine Größe von 2053 bp.

Vor Verwendung des Targeting Vektors wurden die enthaltenen Exons sequenziert, um sicherzustellen, dass bei der Klonierung keine Mutation im kodierenden Bereich aufgetreten war.

Die Sensitivität der PCR Reaktion zur Verifikation der rekombinierten ES-Zellen wurde mit Hilfe eines Kontrollvektors und den Primern „MR N2B K3“ und „3'neoflox“ ermittelt. Hierzu wurde eine definierte Menge von 1 ng -1 fg Plasmid DNA als Template eingesetzt. Die Sensitivität lag bei 100 fg Plasmid Template (Abbildung 10 C) und sollte ausreichen, um Rekombination der ES-Zellen nachzuweisen.

5.1.2 PEVK Targeting

Der PEVK Targeting-Vektor und der Kontrollvektor wurden von Dr. Peng (Washington State University, USA) kloniert und zur Verfügung gestellt.

In diesem Targeting-Vektor wird der Bereich der Exons 219-225 deletiert. Diese Exons sind die einzigen PEVK Exons der herzspezifischen N2B Isoform. Sie sind auch in allen anderen bekannten Titin-Isoformen vorhanden.

Diese PEVK Exons wurden im Targeting-Vektor durch die Frt flankierte Neomycinresistenzkassette ersetzt. Durch homologe Rekombination wird dieser Bereich ins Genom integriert, wobei die Neomycinresistenzkassette später durch Expression der FLP-Rekombinase entfernt werden kann. Zurück bleibt ein Frt-Sequenzelement (Abbildung 11). Durch Verpaarung der heterozygot PEVK defizienten Tiere entstehen homozygote PEVK Knockout Tiere, welche für die Analyse herangezogen werden.

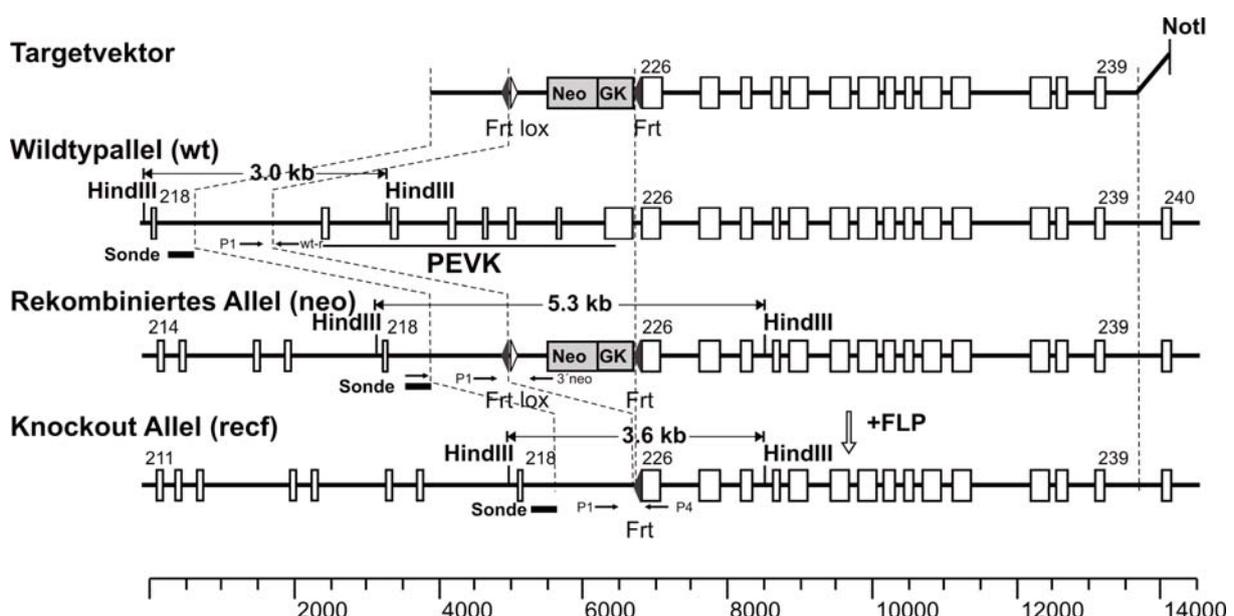


Abbildung 11: Targeting Strategie des PEVK Knockouts. Die Exons 219- 225, welche für die PEVK-Region in der herzspezifischen N2B Isoform kodieren, werden im Targeting-Vektor durch

eine Neomycinresistenzkassette ersetzt. Diese Neomycinresistenzkassette wird nach Rekombination durch die FLP Rekombinase deletiert. Im Knockoutallel bleibt eine Frt-Schnittstelle zurück. Die Bindungsstellen der Genotypisierungsprimer sind als Pfeile, die Bindungsstelle der Southernblot-Sonde als schwarze Box, dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen für *HindIII* im Southernblot sind mit (H) gekennzeichnet. Der Targeting-Vektor wurde mit *NotI* (N) linearisiert.

Auch bei diesem Vektor wurden die vorhandenen Exons sequenziert, um Mutationen, welche den Phänotyp beeinflussen könnten, zu entdecken. Es konnten keine Mutationen im kodierenden Bereich festgestellt werden.

Restriktionsanalysen mit *EcoRI* und *XbaI* bestätigten die vorhergesagte Größe und Orientierung der klonierten Fragmente (Abbildung 12 A).

Zur Überprüfung der Sensitivität der Rekombinations-PCR wurde ein Kontrollvektor benutzt. Die PCR Reaktion mit den Primern JP-con5r und 3'neoflox war so sensitiv, dass 1 fg Kontrollvektor nachgewiesen werden konnte und ist somit für den Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen geeignet (Abbildung 12 B).

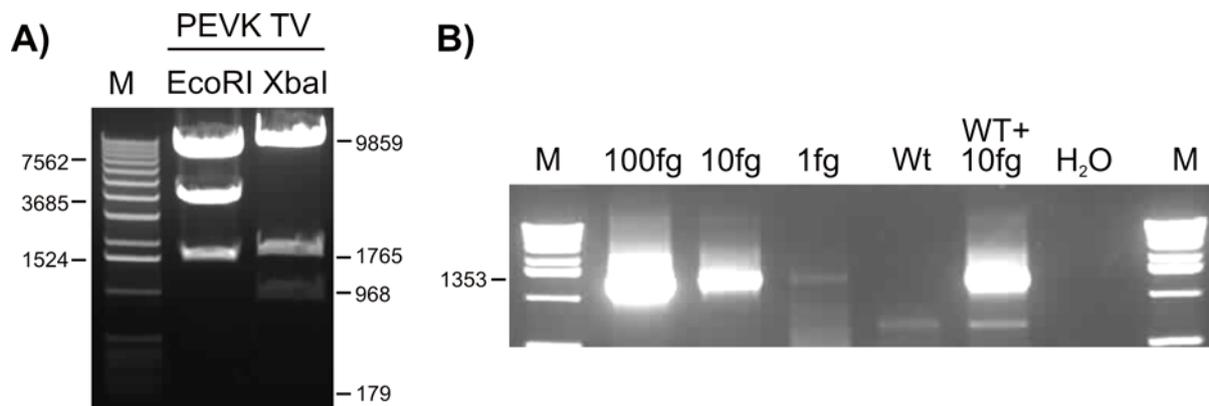


Abbildung 12: Restriktionsanalyse des PEVK Targeting-Vektors und Ermittlung der Sensitivität der Rekombinations-PCR. A) Restriktionsanalyse des PEVK Targeting-Vektors im Verdau mit *EcoRI* und im Verdau mit *XbaI*. Die erwarteten Fragmentgrößen lagen bei dem *EcoRI* Verdau bei 7562, 3685 und 1524 bp; bei dem *XbaI* Verdau bei: 9859, 1765, 968 und 179 bp. B) Die Sensitivität der PEVK Rekombinations-PCR wurde mit Verdünnungen des Kontrollplasmids von 100 fg-1 fg und zusätzlich an 10 fg gemischt mit Wildtyp DNA durchgeführt. Das erwartete PCR Produkt sollte bei Verwendung der Primer „JP-con5r“ und „3'neoflox“ eine Größe von 1353 bp aufweisen.

Beide Targeting-Vektoren zeigten in der Restriktionsanalyse die erwarteten Fragmentgrößen, welches die richtige Orientierung der Fragmente zueinander bestätigte. Weiterhin waren beide Targeting-Vektoren in den Sequenzen ihrer Exons

fehlerfrei. Daher konnten nun beide Vektoren für das Targeting-Experiment mit ES-Zellen der Maus zur Generierung von transgenen Tieren verwendet werden.

5.2 Erzeugung N2B- und PEVK- defizienter Mäuse

Aus vier Targeting-Experimenten für den N2B Targeting-Vektor wurden 720 ES-Zellklone mit PCR und Southernblot auf homologe Rekombination hin untersucht. Es konnten zwei positive ES-Zelllinien, bei denen eine homologe Rekombination nachgewiesen werden konnte, N2B I 94 und N2B VI 6, etabliert werden. Von sieben Blastozysteninjektionen für N2B I 94, waren drei erfolgreich. Dabei entstanden 22 schimäre Tiere. Von drei Blastozysteninjektionen des zweiten N2B ES-Zellklons N2B VI 6, war eine erfolgreich. Aus ihr gingen sechs schimäre Tiere hervor. Beide Klone waren keimbahngängig, so dass die ins Genom integrierte Deletion des Exons 49 an die Nachkommen weitergegeben wurde. Tabelle 14 fasst die Ergebnisse der Targeting-Experimente zusammen.

Tabelle 14: Targeting-Experimente und Generierung der schimären Tiere

	Targeting-Experimente	Untersuchte ES-Zellklone	Positive Klone	ES-Zelllinie	ES-Zell Injektionen (erfolgreich)	Schimäre Tiere	Keimbahngängig
N2B	4	720	2	N2B I 94	7 (3)	22	Ja
				N2B VI 6	3 (1)	6	Ja
PEVK	2	480	1	PEVK II E6	1 (1)	4	Ja

Aus zwei Targeting-Experimenten für den PEVK Targeting-Vektor wurden 480 ES-Zellklone mit PCR und Southernblot auf homologe Rekombination hin untersucht. Es konnte hier eine positive ES-Zelllinie, PEVK II E6 etabliert werden. Aus einer Blastozysteninjektion entstanden vier schimäre Tiere, welche das modifizierte Titin Allel weitervererbten (Tabelle 14).

Durch Verpaarung der schimären Tiere beider Knockouts mit C57BL/6 Tieren konnten die Nachkommen, welche sich aus zu Keimbahnzellen differenzierten ES-Zellen entwickelten, leicht erkannt werden, da sie eine hellbraune (agouti) Fellfarbe aufwiesen. Die agouti farbigen Tiere, welche die Veränderung im Genom trugen, wurden mit FLP-Deleter Tieren verpaart, um die Neomycinresistenzkassette aus dem Genom zu entfernen. In den nächsten Generationen wurde die FLP-Rekombinase

ausgekreuzt und die heterozygoten Tiere zu homozygoten Knockouts verpaart (Abbildung 8). Diese wurden für die Analyse herangezogen.

Überprüfung der N2B bzw. PEVK Defizienz auf genomischer Ebene

Die Genotypisierung der Tiere aus dem N2B Knockout erfolgte durch PCR (Primer siehe Tabelle 6) und Southernblotanalyse (Abbildung 13). Hierbei stimmten die PCR Produkte und die Signale im Southernblot mit den Erwartungen für den N2B Knockout überein.

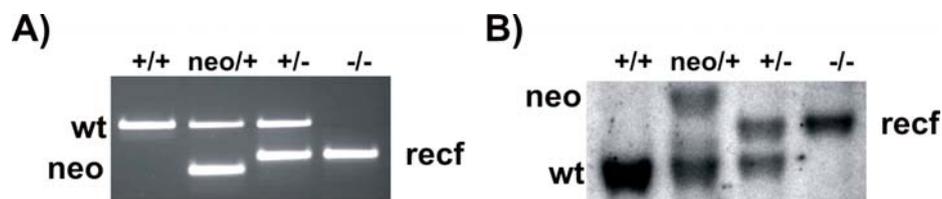


Abbildung 13: Genotypisierung der Tiere im N2B Knockout. A) PCR-Analyse der möglichen Genotypen (Wildtyp +/+; Heterozygot neo/+ oder +/-; Knockout -/-). Die PCR Produkte sind 376 bp für das Wildtypallel (wt), 210 bp für den integrierten Targeting-Vektor mit Neomycinresistenzkassette (neo), 252 bp nach Deletion der Neomycinresistenzkassette (recf). B) Southernblotanalyse derselben Tiere wie in A). Die genomische DNA wurde mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut. Hierbei entstehen die Fragmente 5180 bp für das Wildtypallel (wt), 8102 bp für den integrierten Targeting-Vektor mit Neomycinresistenzkassette (neo) und 6436 bp für das FLP rekombinierte Allel (recf).

Auch für den PEVK Knockout wurden die Genotypen durch PCR und Southernblotanalyse überprüft (Abbildung 14).

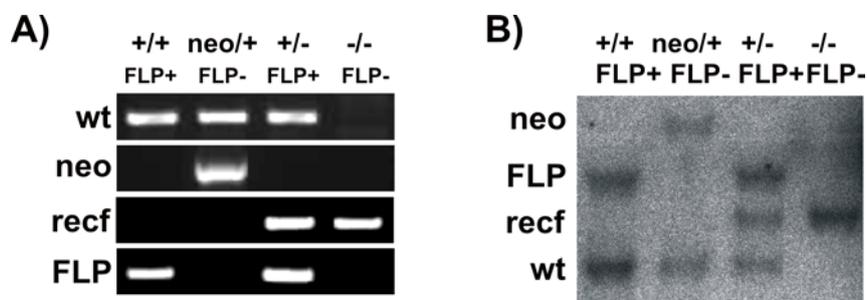


Abbildung 14: Genotypisierung der Tiere im PEVK Knockout. A) PCR-Analyse der verschiedenen möglichen Genotypen des PEVK Knockouts (Wildtyp +/+; Heterozygot neo/+ oder +/-; Knockout -/-). Nachweis des Wildtypallels (wt) bei 542 bp, für den integrierten Targeting-Vektor mit Neomycinresistenzkassette (neo) bei 583 bp, für den integrierten

Targeting-Vektor nach FLP-Rekombination (recf) bei 587 bp und für das Vorhandensein des FLP Allels bei 480 bp. B) Southernblotanalyse derselben Tiere wie in A). Genomische DNA wurde mit *HindIII* verdaut. Die Fragmente von 3051 bp für das Wildtypallel (wt), 5368 bp für den integrierten Targeting-Vektor mit Neomycinresistenzkassette (neo) und 3603 bp für das FLP rekombinierte Allel (recf) konnten durch die Sonde nachgewiesen werden. Auch das FLP Allel (FLP) ergab eine Bande bei ca. 4 kb.

Für den PEVK Knockout entsprachen die nachgewiesenen PCR Produkte und auch die Signale im Southernblot den Erwartungen.

Durch PCR und Southernblot konnte ich somit auf genomischer Ebene eindeutig zeigen, dass die gewünschte Region (N2B bzw. PEVK) durch homologe Rekombination des Targeting-Vektors aus dem Genom deletiert wurde. Da durch Expression der FLP-Rekombinase die Neomycinresistenzkassette entfernt wurde, sollte der entstehende Phänotyp ausschließlich auf die Deletion im Titingen zurückzuführen sein.

Da homozygot N2B bzw. PEVK defiziente Tiere überleben, sind diese Domänen nicht essentiell für Embryonalentwicklung und die Sarkomerogenese.

Somit waren beide Targeting-Strategien erfolgreich. Es konnten damit zwei neue Knockout Modelle etabliert werden, die für die Analyse der mechanischen Eigenschaften von Titin und die Untersuchung der Signaltransduktion *in vivo* zur Verfügung stehen.

5.3 Analyse der N2B- bzw. der PEVK- defizienten Tiere

Für sämtliche Analysen wurden Tiere aus heterozygoten Geschwisterverpaarungen verwendet.

Die N2B- und auch die PEVK-defizienten Tiere sind nicht embryonal letal, entwickeln sich normal und weisen keinen offensichtlichen Phänotyp auf. Die genetische Verteilung der Nachkommen entspricht den Mendelschen Regeln (N2B n= 365 Tiere; N2B^{+/+} = 81; N2B^{+/-} = 169; N2B^{-/-} = 105; PEVK n= 304 Tiere; PEVK^{+/+} = 71; PEVK^{+/-} = 156; PEVK^{-/-} = 77).

5.3.1 Expressionsanalyse der mutierten Titin RNA-Transcripte

Um nach erfolgreicher Bestätigung der Deletionen auf genomischer Ebene diese auch auf Ebene der RNA zu überprüfen, wurde die Titin Expression mit Hilfe eines Titin-Exonchips untersucht. Die Untersuchung der N2B- bzw. PEVK-defizienten Titin RNA von adulten Tieren wurde von X. Luo im Labor von H. Granzier an der

Washington State University (Pullman, USA) durchgeführt. Die Titin Exonchips stammen von S. Labeit (Univesitätsklinikum Mannheim). Dieser Exonchip ermöglicht es alle Titin Exons auf RNA-Ebene zu detektieren.

Diese Analyse bestätigte, dass im N2B Knockout allein das Exon 49 fehlt, welches die N2B-Region codiert (Abbildung 15).

Ähnlich auch in dem PEVK Knockout, hier sind die Exons 219 bis 225, welche die einzigen PEVK Exons in der herzspezifischen N2B Isoform von Titin sind, in der RNA von PEVK knockout Herzen nicht mehr nachweisbar (Abbildung 15).

Diese sind genau die Exons, welche durch die Targetingstrategie deletiert werden sollten. Weitere Exons, die sowohl im Wildtyp als auch in den Knockouts kein Signal geben, sind Skelettmuskelspezifisch und werden im Herzen nicht exprimiert. Hierzu gehören u.a. auch viele PEVK und Immunglobulin Domänen codierende Exons der I-Bande.

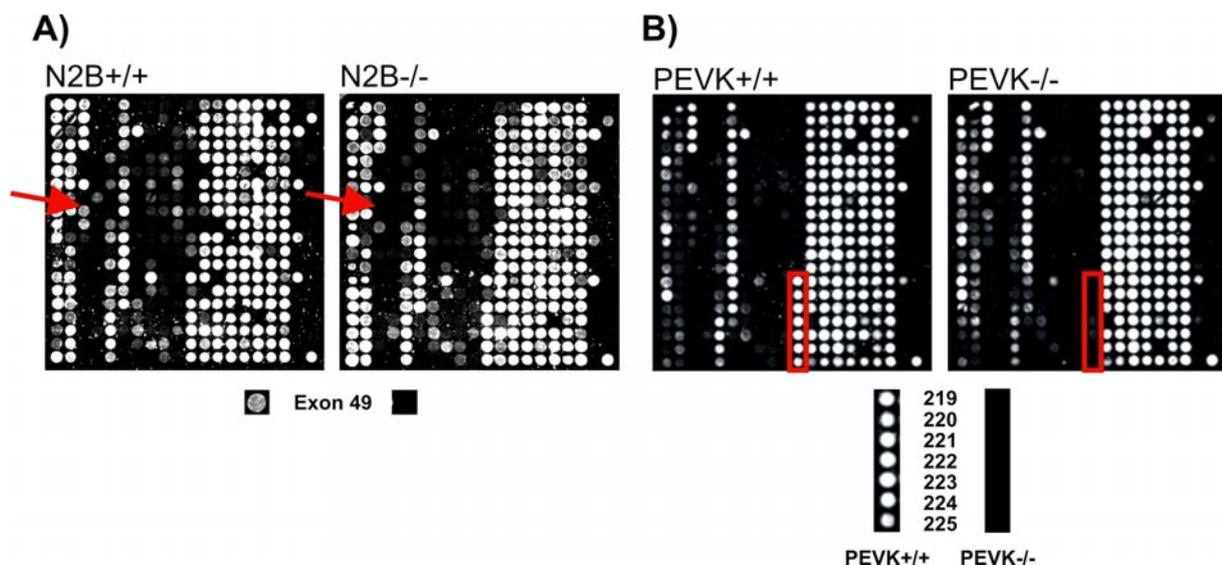


Abbildung 15: Expressionsanalyse der Titin Exons von RNA des linken Ventrikels mit Hilfe eines Titin-Exonchips. A) Detektion der Titin Exons im Wildtyp (N2B+/+) und im N2B Knockout (N2B-/-). Exon 49 (N2B-Region) zeigt nur ein Signal im Wildtyp, nicht jedoch im N2B Knockout. B) Detektion der Titin Exons im Wildtyp (PEVK+/+) und im PEVK Knockout (PEVK-/-). Im PEVK Knockout zeigen die in der herzspezifischen N2B Titinisoform exprimierten PEVK Exons 219-225 kein Signal.

Hiermit konnte auf RNA-Ebene bestätigt werden, dass im N2B Knockout nur das Exon 49 und im PEVK Knockout nur die Exons 219 bis 225 deletiert sind. Die Expression der übrigen Exons von Titin werden jedoch nicht durch die Deletionen

beeinflusst. Die Untersuchung der RNA durch den Exonchip, lässt jedoch keine Quantifizierung der Signale zu. Es kann hier nur eine Aussage über das Vorhandensein oder Fehlen eines Exons getroffen werden, nicht jedoch über seine Menge.

5.3.2 Analyse der mutierten Titinproteine

Nachdem auf genetischer und auf RNA-Ebene die Deletion der N2B Domäne bzw. der im Herzen exprimierten PEVK-Region nachgewiesen werden konnte, folgt nun die Untersuchung der mutierten Titin Proteine.

Hierzu wurden die Titinproteine von Wildtyp, Heterozygoten und Knockout Tieren im Agarosegel und im Westernblot untersucht.

5.3.2.1 N2B-defizientes Titin ist verkürzt

Riesige Proteine wie Titin lassen sich nur schlecht mit dem Laemli SDS-Acrylamid Gelsystem auftrennen und müssen daher im Agarosegel separiert werden. Hierbei lassen sich die im Herzen natürlich vorkommenden Titin Isoformen N2B und N2BA unterschieden. Im N2B-defizienten Herzen ist das Titinprotein um 881 Aminosäuren verkürzt. Die verkürzten Isoformen sollten sich im Titin Agarosegel von den natürlichen Titin Isoformen trennen lassen.

Das PEVK-defiziente Titin enthält ein um nur 281 Aminosäuren verkürztes Molekül und ist daher, wie in Abbildung 16 zu erkennen, im Titin Agarosegel nicht mehr vom Wildtyp abzutrennen. Die Expression von Titin wird jedoch durch die Mutation nicht beeinflusst und es tritt auch kein vorzeitiger Translationsabbruch auf.

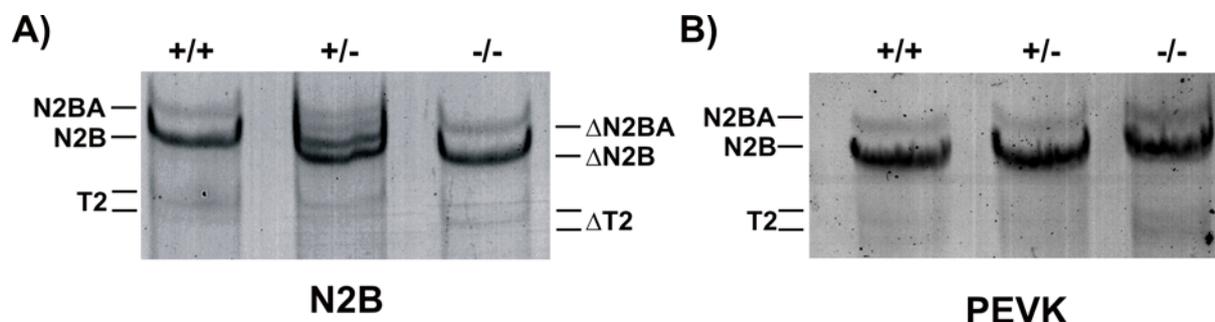


Abbildung 16: Coomassie gefärbtes 2%iges Agarosegel mit Herzlysat des linken Ventrikels von A) N2B und B) PEVK wildtyp (+/+), heterozygot (+/-) und knockout (-/-) Tieren. Die N2BA und N2B Isoformen sowie die T2 Degradationsprodukte sind gekennzeichnet. A) Im N2B heterozygoten Tieren wird sowohl wildtyp als auch mutiertes Titinprotein (größere Mobilität) exprimiert. Der N2B Knockout exprimiert nur die verkürzten, mutierten Isoformen (ΔN2BA und

Δ N2B). B) Im PEVK Knockout ist eine Auftrennung zwischen wildtyp und mutierten Titin Isoformen auf Grund des geringen Größenunterschieds nicht möglich. Die Expression des Titinproteins ist nicht beeinträchtigt.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, ließen sich die N2B-defizienten Isoformen von den Wildtyp Isoformen trennen. Im heterozygoten Tier sind beide Isoformen (nativ N2B und mutiert Δ N2B) gleich stark exprimiert. Die N2B Deletion wirkt sich somit nicht auf die Stabilität des Proteins aus. T2 ist das Degradationsprodukt von Titin und gibt Aufschluss über die Qualität der Präparation. Da die T2 Bande hier nur sehr schwach zu erkennen ist, weist dieses auf eine gute Proteinpräparation hin.

5.3.2.2 Exon 49 ist im N2B Knockout deletiert

Um eindeutig zu zeigen, dass dem verkürzten N2B^{-/-} Titinprotein tatsächlich nur die N2B-Region und Ihre angrenzenden IG Domänen des Exons 49 fehlen, wurde das Protein im Westernblot mit verschiedenen Antikörpern gegen Titin untersucht.

Die Überprüfung des PEVK Knockouts konnte nicht im Westernblot erfolgen, da hierfür kein PEVK spezifischer Antikörper existiert, der im Westernblot eingesetzt werden kann.

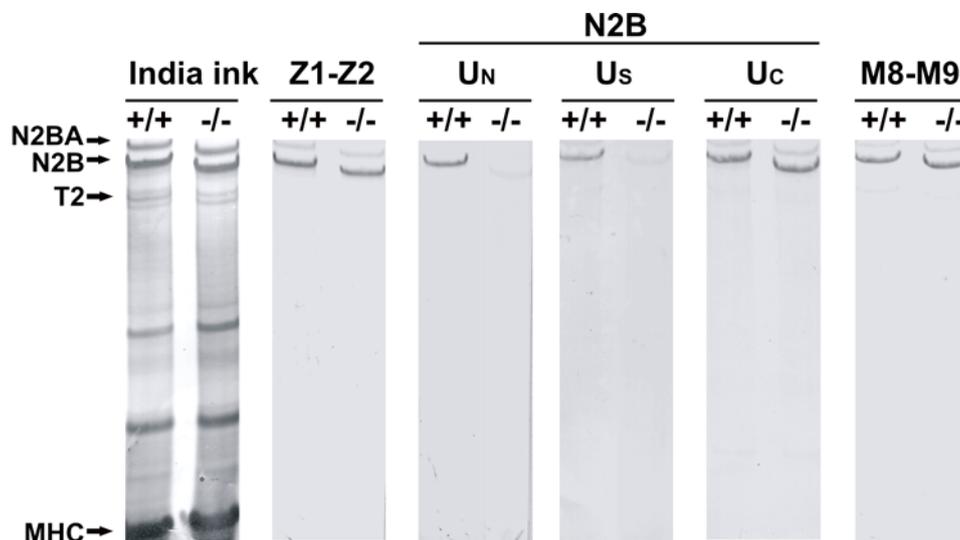


Abbildung 17: Westernblotanalyse von Herzlysat von Wildtyp (+/+) und N2B-defizienten (-/-) Tieren. Proteinfärbung mit Indischer Tinte (India ink) zeigt gleiche Beladung für (+/+) und (-/-). Der Antikörper Z1-Z2 erkennt den N-terminalen Bereich von Titin. Die Antikörper U_N und U_S erkennen den N-terminalen bzw. den mittleren Bereich der N2B-Region. Der Antikörper U_C erkennt den Übergang vom Exon 49 (N2B) zu Exon 50. Der C-terminale Bereich von Titin wird durch den Antikörper M8-M9 erkannt. Im N2B Knockout wird nur das Exon 49 mit der N2B-Region deletiert. Der N-terminale und der C-terminale Bereich von Titin ist nicht verändert.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Titinprotein vom N-Terminus (Antikörper Z1-Z2) bis zum C-Terminus (Antikörper M8-M9), translatiert wird. Um die Expression der N2B-Region zu untersuchen, wurden N2B spezifischen Antikörper am N-Terminus (U_N , IG Domänen I23 und I25), in der unikalen Region (U_S), und am C-Terminus der N2B-Region verwendet (U_C , IG Domänen I26 und I27). Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, zeigen die Antikörper U_N und U_S nur ein Signal im Wildtyp nicht jedoch im N2B Knockout. Die N2B-Region ist hier nicht vorhanden. Der Antikörper U_C zeigt hingegen auch im N2B Knockout ein Signal, welches bestätigt, dass das Exon 50 hier noch vorhanden ist.

Es liegt somit ein nur um die N2B-Region verkürztes Titinprotein vor, wie es in der Targetingstrategie auch beabsichtigt war. Titins N- und C-Terminus sind von der Deletion nicht beeinflusst.

5.3.2.3 Erhöhte Expression der N2BA Isoformen im N2B Knockout

Um zu untersuchen, ob die Deletion der N2B-Region die Expression der Titin Isoformen verändert, wurden diese im 2%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Quantifizierung der Titin Isoformen des N2B Knockouts aus den Coomassie gefärbten Proteinagarosegelen ergab, dass bei heterozygoten und homozygoten N2B Knockout Tieren das Titin Isoformenverhältnis im Vergleich zum Wildtyp weiter zur N2BA Isoform verschoben wird (Abbildung 18).

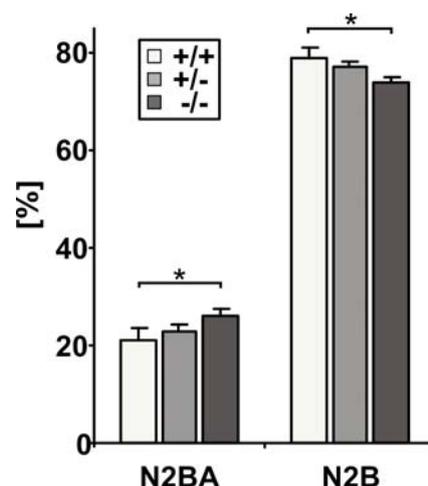


Abbildung 18: Der Verlust der N2B-Region führt zu einer Veränderung des Isoformenverhältnisses von Titin. Während die Gesamttitinproteinmenge im Vergleich von Wildtyp und N2B Knockout nicht verändert ist, zeigt der Verlust der N2B-Region eine kompensatorische Hochregulation der längeren N2BA Isoform in heterozygoten (+/-) und N2B knockout (-/-) Tieren. Untersucht wurden n= 6 Tiere pro Genotyp. Der Unterschied in der

Isoformenexpression ist zwischen N2B^{+/+} und N2B^{-/-} signifikant P < 0.05 (ANOVA Post Hoc Tukey HSD).

Während im Wildtyp 21% der N2BA und 79% der N2B Isoform vorhanden ist, ändert sich das Isoformenverhältnis in heterozygoten Tieren zu 23% N2BA und 77% N2B und im Knockout zu 26% N2BA und 74% N2B. Bei den heterozygoten Tieren wurden die Werte der nativen und der mutierten Titin N2B bzw. N2BA Isoform addiert.

Die Gesamtproteinmenge von Titin, normalisiert auf die schwere Kette des Myosins (MHC), ist im heterozygoten und im N2B knockout Herzen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

Die Deletion der elastischen N2B-Region, welche ein steiferes Titin zur Folge hat, führt demnach zu einer erhöhten Expression der schlafferen N2BA Isoform.

5.3.3 Phänotypische Analyse der N2B- und PEVK-defizienten Tiere

5.3.3.1 Die Deletion der N2B-Region führt zu verkleinerten Herzen

Durch die Deletion der Herzspezifischen N2B Isoform wurde eine Veränderung in der Herzstruktur und Funktion erwartet. Um hier einen ersten Eindruck zu erlangen, ob eine Veränderung vorliegt, wurden die Ventrikelgewichte ermittelt. Sowohl die homozygot N2B-defizienten, als auch die heterozygoten Tiere, weisen ein reduziertes Ventrikelgewicht / Körpergewicht Verhältnis im Vergleich zu wildtyp Tieren aus der gleichen Kreuzung auf.

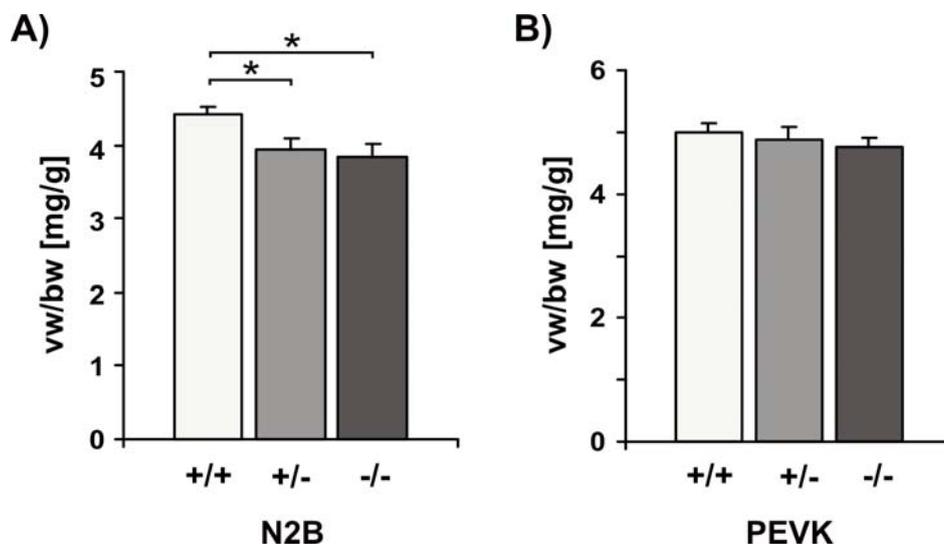


Abbildung 19: Reduziertes Ventrikelgewicht / Körpergewicht Verhältnis im N2B Knockout. A) Die Deletion der N2B-Region führt zu einem geringeren Ventrikelgewicht (vw) / Körpergewicht

(bw) Verhältnis. B) Die Deletion der PEVK-Region hat keinen Einfluss auf das Ventrikelgewicht / Körpergewicht Verhältnis. Es wurden Ventrikel adulter Tiere (3-6 Monate) gemessen; für N2B: (+/+) n=13, (+/-) n=12, und (-/-) n=16 Tiere; für PEVK: (+/+) n=6, (+/-) n=9, und (-/-) n=10. Unterschiede im N2B Knockout sind signifikant bei $P < 0.05$ (ANOVA Post Hoc Tukey HSD).

Das Verhältnis von Ventrikelgewicht zu Körpergewicht liegt in jungen adulten männlichen Wildtyptieren bei 4,4 mg/g, in heterozygoten und homozygoten KO Tieren nur bei 3,9 mg/g (N2B^{+/-}) bzw. 3,8 mg/g (N2B^{-/-}) (Abbildung 19).

Die PEVK-defizienten adulten Tiere zeigten kein verändertes Verhältnis von Ventrikel- zu Körpergewicht im Vergleich von Wildtyp, Heterozygoten und Homozygoten (4,8 – 5.0 mg/g).

Der Verlust der N2B-Region führt somit zu einem verkleinerten Ventrikel, wohingegen der Verlust der PEVK-Region in jungen adulten Tieren keinen Einfluss auf das Ventrikelgewicht hat.

5.3.3.2 Die Deletionen verursachen keine strukturellen Änderungen des Herzmuskels und seiner Zellen

Zur Untersuchung der Struktur des Herzmuskels nach Deletion von N2B oder PEVK, wurden Hämatoxylin & Eosin gefärbten Parafinschnitte im Lichtmikroskop untersucht. Es konnte kein Unterschied der mikroskopischen Herzmuskelstruktur von N2B^{-/-} und PEVK^{-/-} Tieren im Vergleich zu Wildtyp- Herzen festgestellt werden (Abbildung 20 A).

Um zu erkennen, ob beim N2B oder PEVK Knockout zusätzliches Kollagen zum Ausgleich der veränderten Steifheit des Sarkomers eingelagert wird, wurden die Parafinschnitte der Herzen Trichrom mit Azan novum nach Geides gefärbt. Hierbei werden kollagene Strukturen blau und Muskelgewebe rötlich gefärbt (Abbildung 20 B). Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den N2B- bzw. PEVK-defizienten und den Wildtyp- Herzschnitten festgestellt werden. Ob eine Veränderung der Steifheit durch unterschiedlich starke Expression von Kollagen im N2B bzw. PEVK Knockout vorliegt, bleibt an isolierten Muskelfasern zu überprüfen.

Der Aufbau des Herzens ist durch die Deletion der N2B-Region oder PEVK-Region auf lichtmikroskopischer Ebene somit nicht verändert worden.

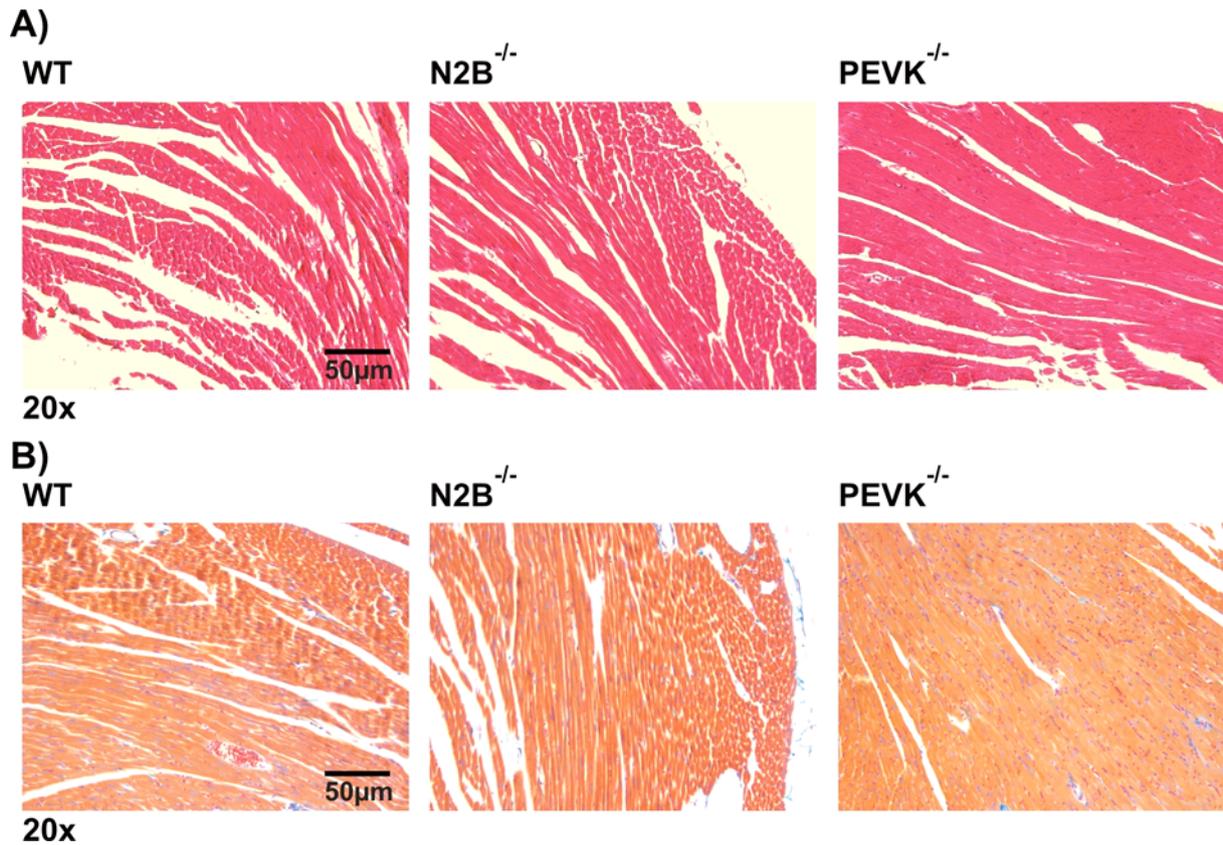


Abbildung 20: Die Herzmuskelstruktur in N2B- und PEVK-defizienten Tieren ist unverändert. Parafinschnitte von wildtyp (WT), N2B^{-/-} und PEVK^{-/-} Herzen gefärbt mit A) Hämatoxylin & Eosin, oder B) Trichrom gefärbt mit Azan novum nach Geides. Kollagen und Bindegewebe sind blau, Muskelgewebe rötlich angefärbt. Aufnahmen bei 20x Vergrößerung, Messbalken = 50 μm.

Um zu überprüfen, ob der Sarkomeraufbau beeinträchtigt wird, wurden Wildtyp, N2B-Knockout und PEVK-Knockout Kardiomyozyten mit Antikörpern gegen die deletierte N2B-Region und gegen den M-Band Bereich von Titin gefärbt. Als Referenz wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen Aktinin gefärbt, der den Z-Scheiben Bereich markiert.

Wie in Abbildung 21 A zu erkennen ist, zeigen die Wildtypzellen auf Grund der geringen Entfernung von Aktinin in der Z-Scheibe und N2B in der I-Bande eine Überlagerung der Signale. Die N2B-defizienten Kardiomyozyten weisen jedoch keine N2B spezifische Antikörperfärbung auf, wohingegen beim PEVK Knockout, wie beim Wildtyp, ein klares Streifenmuster in der I-Bande zu erkennen ist.

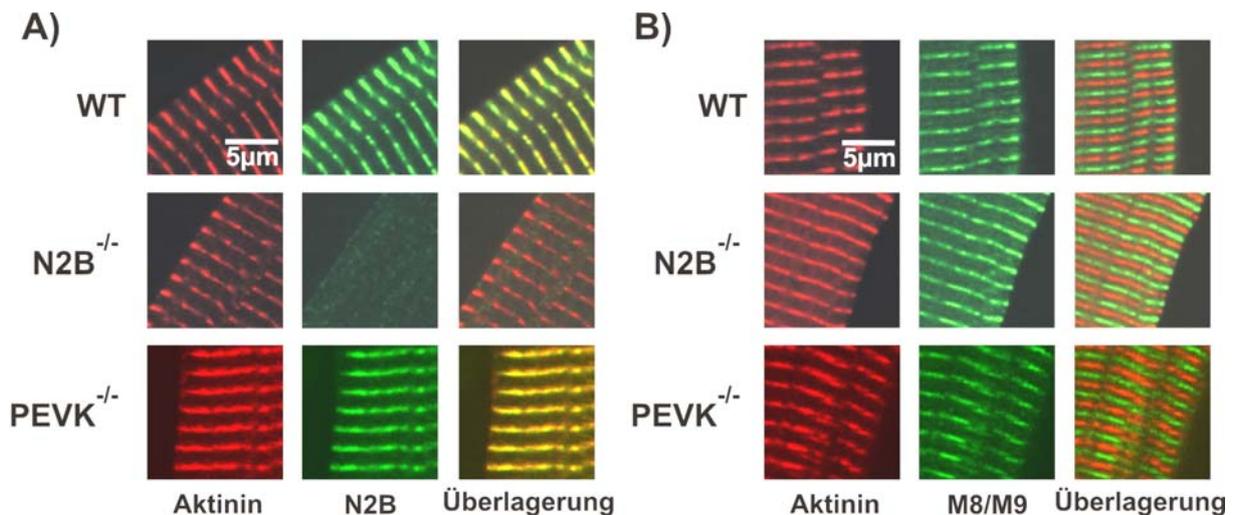


Abbildung 21: Die Struktur des Sarkomers wird durch die Deletion von N2B oder PEVK nicht gestört. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp (WT), N2B Knockout ($N2B^{-/-}$) und PEVK Knockout ($PEVK^{-/-}$) Kardiomyozyten, die mit Antikörpern A) gegen Actinin (rot) und N2B (grün), oder B) gegen Actinin (rot) und die M-Bande von Titin mit dem Antikörper M8-M9 (grün) inkubiert wurden. Die N2B-Region zeigt im N2B Knockout kein Signal, während Aktinin und M8-M9 ein abwechselndes Streifenmuster zeigen. N2B und PEVK Knockout zerstören somit nicht die Sarkomerstruktur und integrieren in die M-Bande. Messbalken = 5 μm .

Die Färbung der M-Bande durch den Titin-spezifischen Antikörper M8-M9 zeigt bei beiden Knockouts wie im Wildtyp eine regelmäßige Abfolge von Z-Scheiben und M-Banden (Abbildung 21 B). Die Sarkomerstruktur wurde demnach durch die Deletion der N2B-Region oder der PEVK-Region nicht beeinflusst. Das mutierte Titinprotein integriert ebenso wie das Wildtypprotein in die M-Bande.

Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung von N2B-Knockout-Muskelfasern ergab, dass die N2B-Region zwar deletiert ist, aber der Aufbau des Sarkomers nicht gestört ist.

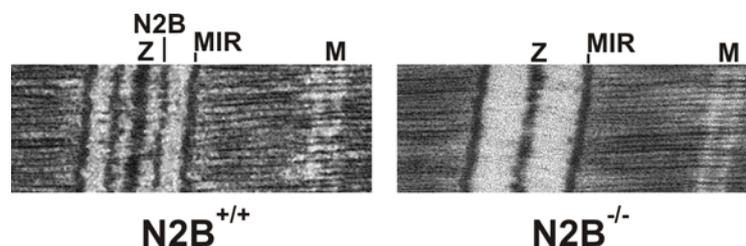


Abbildung 22: Die Struktur des Sarkomers bleibt im N2B Knockout erhalten. Immun-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Muskelfasern des linken Ventrikels von $N2B^{+/+}$ und $N2B^{-/-}$ Tieren behandelt mit Antikörpern gegen die N2B-Region und gegen das MIR Epitop (A-I

Übergang). Nur im Wildtyp ist die N2B-Region nachweisbar. Die Struktur des Sarkomers ist im N2B Knockout im Vergleich zum Wildtyp unverändert. (Abbildung von McNabb, WSU).

Die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen das MIR Epitop und gegen die N2B Domäne inkubiert. Während der N2B Antikörper im Wildtyp zwischen Z-Scheibe und A/I Übergang (MIR- Epitop) bindet, zeigt der N2B Knockout nur die korrekte Lokalisierung des MIR Antikörpers am A/I Übergang (Abbildung 22). Die Struktur des Sarkomers ist nicht verändert.

Eine Immunhistologische Untersuchung der PEVK Deletion war nicht möglich, da der einzige PEVK-spezifische Antikörper (9D10) in der Immunhistochemie nicht funktioniert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der PEVK-defizienten Muskelfasern ist in Vorbereitung.

5.3.3.3 N2B-defiziente Muskelfasern zeigen erhöhte Steifheit und verkürzte Sarkomere

Um mehr über die Elastizitätsveränderung, die durch die Deletion der N2B-Region entsteht, zu erfahren, wurde die mechanischen Eigenschaften der Muskelfasern untersucht (Dr. Wu im Labor von H. Granzier an der Washington State University - Pullman, USA).

Um die passive Spannung zu messen, wurden die Muskelfasern des linken Ventrikels präpariert, „gehäutet“ und das eine Ende mit einem Motor, das andere mit einen Kraftmesser verbunden. Der Zellquerschnitt wurde mikroskopisch, die Sarkomerlänge durch Laser-Beugung ermittelt. Die Messungen ergaben, dass die N2B-defizienten Muskelfasern zwar den gleichen Querschnitt wie die Muskelfasern des Wildtyps aufweisen (Abbildung 23 A), die Sarkomer-Länge jedoch von 1,94 μm im Wildtyp auf 1,86 μm im N2B Knockout signifikant verkürzt ist (Abbildung 23 B). Die maximale Kraft, die der Muskel bei einer bestimmten Länge entwickeln kann (activation force), ist im N2B Knockout nicht verändert (Abbildung 23 C). Die passive Steifheit der Muskelfasern von N2B-defizienten Tieren ist im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abbildung 23 D). Sie beruht hauptsächlich auf Titin, da die Kollagen abhängige Steifheit erst bei größeren Sarkomerlängen zum Tragen kommt.

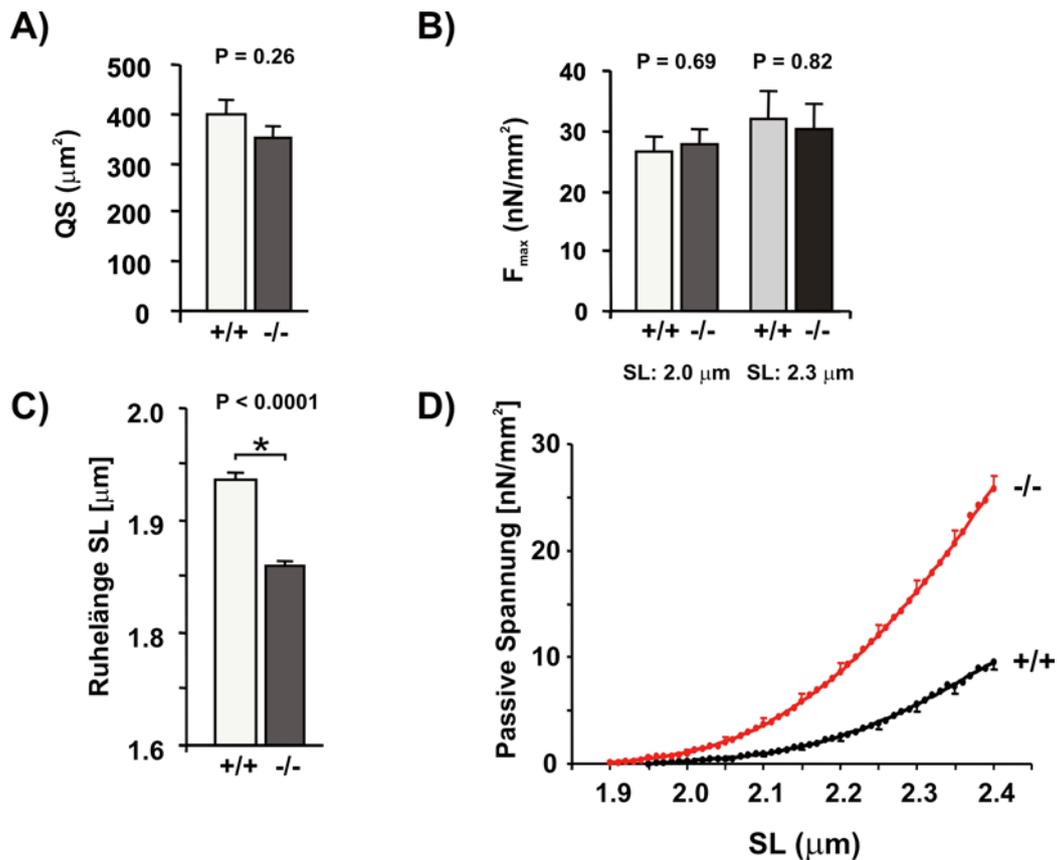


Abbildung 23: N2B-defiziente Muskelfasern zeigen erhöhte passive Steifheit und weisen eine verkürzte Ruhelänge der Sarkomere auf. A) Querschnitt (QS) und B) Maximale Kraftentwicklung sind bei den Sarkomerlängen (SL) 2 μm und 2,3 μm in Wildtyp (+/+) und N2B-defizienten (-/-) Muskelfasern vergleichbar. C) Die Ruhelänge des Sarkomers ist im N2B Knockout (n=65) im Gegensatz zum Wildtyp (n=82) signifikant verkürzt D), die passive Steifheit ist in N2B-defizienten Herzmuskelfasern ab einer Sarkomerlänge von 2 μm erhöht. Muskelfasern von 6 Monate alten N2B knockout (n=11) und wildtyp (n=10) Tieren wurden untersucht.

N2B-defiziente Sarkomere sind somit steifer und verkürzt, die erzeugte Kraft ist jedoch unverändert. Auch bei Verschiebung der passiven Spannungskurve entsprechend der verkürzten Sarkomerlänge bleibt die Steifheit der Muskelfasern erhöht.

5.3.3.4 PEVK und proximale IG Domänen kompensieren den Verlust der N2B Domäne

Um festzustellen ob und auf welche Bereiche Titins sich die Deletion der N2B-Region auswirkt, wurde die Ausdehnung der verschiedenen Titin-Domänen im Bereich der I-Bande elektronenmikroskopisch untersucht.

Die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Messungen der Epitopabstände zur Z-Scheibe wurde von M. McNabb im Labor von H. Granzier an der Washington State University (Pullman, USA) durchgeführt.

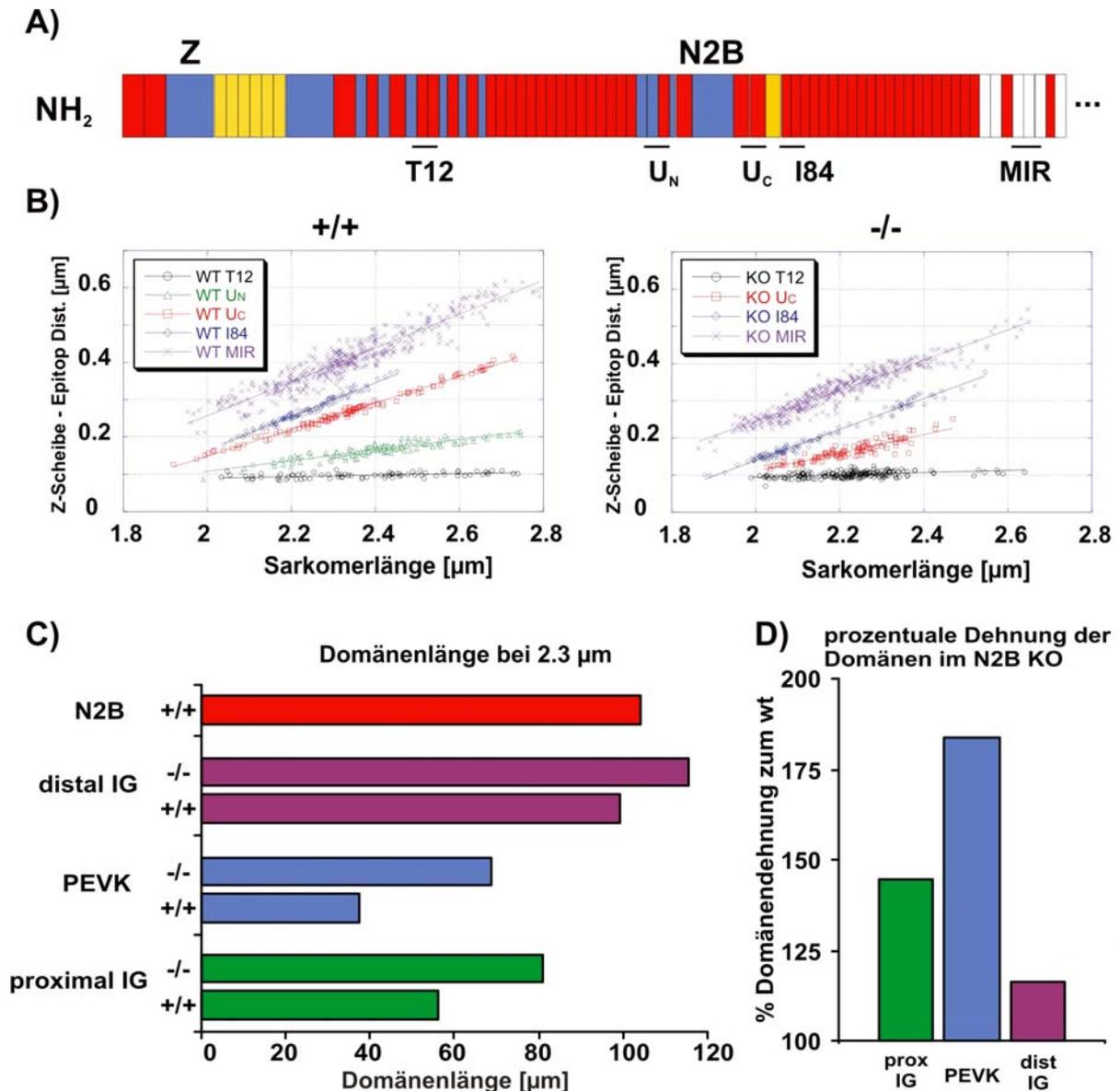


Abbildung 24: Die PEVK-Region und IG Regionen kompensieren den Verlust der N2B-Region. A) Bindungsstellen der verwendeten Antikörper entlang der Titin I-Bande. B) Messung der Epitopabstände von der Z-Scheibe bei verschiedenen Sarkomerlängen von Wildtyp (+/+) und N2B-defizienten (-/-) Muskelstreifen in der Immun-Elektronenmikroskopie. C) Segmentlänge der verschiedenen Bereiche bei maximaler physiologischer Länge von 2,3 µm. Die Länge der IG Domänen und der PEVK-Region ist im N2B Knockout erhöht. D) Prozentuale Dehnung der IG und PEVK Domänen im N2B Knockout im Vergleich zum Wildtyp bei 2,3 µm (wt = 100%). Der Verlust der N2B-Region führt hauptsächlich zur Dehnung der PEVK-Region, gefolgt von der Dehnung der proximalen und distalen IG Domänen.

Durch Markierung von Wildtyp und N2B-Knockout Herzmuskel mit Antikörpern gegen verschiedene Bereiche der I-Bande von Titin (Abbildung 24 A) und Messung der Abstände der Antikörper bei unterschiedlichen Sarkomerlängen, lässt sich die Dehnung von Titin verfolgen (Abbildung 24 B).

Der Antikörper T12 bindet nahe der Z-Scheibe. Bei einer Dehnung des Sarkomers im endphysiologischen Bereich ($SL = 2,3 \mu\text{m}$) wird die Region zwischen Z-Scheibe und T12 nur gering gedehnt. Der Bereich zwischen den Bindungsstellen der Antikörper T12 und U_N , (N-Terminus der N2B-Region) besteht hauptsächlich aus Immunglobulin Domänen (IG). Im N2B Knockout entspricht dieser Bereich dem Segment von T12 bis U_C . Diese proximalen IG Domänen werden im N2B Knockout um 44% mehr gedehnt als im Wildtyp.

Die Antikörpern U_C und I84 flankieren die PEVK-Region, das zweite Federelement des Titin Moleküls. Er ist im N2B Knockout im Vergleich zum Wildtyp um 84% länger. Der Bereich zwischen den Antikörpern I84 und MIR enthält die distalen IG Domänen, die bei der Sarkomerlänge von $2,3 \mu\text{m}$ im N2B Knockout um 17% länger sind als im Wildtyp. Der Bereich zwischen MIR Epitop und M-Linie entspricht der A-Bande und besteht aus Immunglobulindomänen und FN3 Domänen. Er ist mit dem Myosinfilament verbunden und kann daher nur gering gedehnt werden.

Das Fehlen der N2B-Region wird also hauptsächlich durch Dehnung der PEVK-Region und durch Dehnung der proximalen IG Domänen kompensiert.

Der Verlust der N2B-Region führt somit zu verkleinerten Herzen mit steiferen Sarkomeren und zu einer leicht erhöhten Expression der N2BA Isoform die nur partiell die erhöhte Steifheit ausgleicht. Eine Störung der Herz- oder Sarkomerstruktur konnte jedoch, bis auf eine verkürzte Sarkomerruhelänge, nicht festgestellt werden. Durch den Verlust der N2B-Region wird die PEVK-Region stärker gedehnt.

5.3.4 Analyse von Funktion und kontraktile Eigenschaften des Herzens

Durch die Deletion der N2B bzw. der PEVK-Region, die auf molekularer Ebene bestätigt wurde sind neben den beschriebenen phänotypischen Veränderungen auch Änderungen der Herzfunktion zu erwarten.

Ein Überblick wurde durch echokardiographische Untersuchung der Tiere erlangt. Die Analyse der Druck und Pumpfunktion erfolgte am isoliert arbeitenden Herzen. Die kontraktile Eigenschaften wurden an isolierten Kardiomyozyten untersucht.

5.3.4.1 Der Verlust der N2B-Region beeinträchtigt die diastolische Funktion des Herzens und der Verlust der PEVK-Region führt zu erhöhter Herzfrequenz

Mit Hilfe der Echokardiographie sollte geklärt werden, ob die Deletion der N2B bzw. der PEVK-Region Einfluss auf die Herzfunktion hat. Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen aus B- und M-Modus zusammen (Methodik - 4.3.3).

Tabelle 15 Analyse der echokardiographischen Untersuchung von N2B^{+/+}, N2B^{-/-} und PEVK^{-/-} Tieren im B-Modus und M-Modus

	Bw (g)	LVWc/ BW (mg/g)	Herzrate (Spm)	IVS;d (mm)	Vol;d (μ l)	Vol;s (μ l)	LV FS (%)	Schlag- volumen (μ l)
N2B^{+/+}	27.1 \pm 0.9	3.6 \pm 0.2	480 \pm 13	0.78 \pm 0.03	65.2 \pm 4.7	29.6 \pm 3.4	29.2 \pm 2.1	35.6 \pm 2.8
N2B^{-/-}	28.7 \pm 0.9	2.8 \pm 0.1 *	466 \pm 15	0.79 \pm 0.03	51.5 \pm 2.1 *	18.5 \pm 1.4*	35.6 \pm 1.9 *	32.9 \pm 1.6
PEVK^{-/-}	25.2 \pm 1.7	3.8 \pm 0.2	546 \pm 27 *	0.83 \pm 0.03	67.1 \pm 5.9	37.3 \pm 2.6	25.5 \pm 3.2	29.7 \pm 4.4

Bw = Körpergewicht; LVWc/BW = linkes korrigiertes Ventrikelgewicht pro Körpergewicht; IVS;d = diastolische innere Ventrikelwanddicke des Septums; Vol;d = diastolisches Volumen; Vol;s = systolisches Volumen; LV FS= Fraktionales shortening (prozentuale Verkürzung) des linken Ventrikels. N2B^{+/+} n=9; N2B^{-/-} n=9; PEVK^{-/-} n=7. * signifikant bei P < 0,05

Durch die echokardiographischen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die N2B-defizienten Herzen kleiner sind. Ein verringertes Ventrikelgewicht (-22%) geht mit einem geringeren Ventrikelvolumen einher (Vol d = -21%; Vol s = -37,5%). Die Wanddicken des Ventrikels sind nicht verändert. Die Herzen der N2B-defizienten Tiere zeigen keine Anzeichen für eine kompensatorische Hypertrophie. Das kleinere Herz kompensiert jedoch sein geringes Volumen durch eine erhöhte Kontraktion (fractional shortening) (LV FS; + 6,4%), so dass das Schlagvolumen des N2B-Knockout-Herzens dem des Wildtypen angeglichen wird.

Die Tiere, denen die PEVK-Region fehlt, zeigten eine höhere Herzfrequenz während der Echokardiographie. Hierdurch sind die weiteren Messwerte auch nur bedingt mit

den Wildtyptieren vergleichbar, da die veränderte Herzfrequenz auch die systolischen und diastolischen Parameter beeinflussen kann. Es zeigte sich ein erhöhtes systolisches Volumen (+ 26%) bei gleichem diastolischem Volumen. Das „fractional shortening“ ist in PEVK-defizienten Tieren, verglichen mit dem Wildtyp leicht reduziert (LV FS – 3,7%). Diese Daten erreichten jedoch nicht statistische Signifikanz. Das Ventrikelgewicht ist beim PEVK-Knockout im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

Die diastolische Funktion wurde durch die Doppleranalyse im apikalen Zweikammerblick am mitralen Blutstrom untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16 Doppler Untersuchung der mitralen Blutströme in N2B^{+/+}, N2B^{-/-} und PEVK^{-/-} Herzen

	MV AT (ms)	MV DT (ms)	IV RT (LV) (ms)	ET (LV) (ms)	MV E/A
N2B^{+/+}	14.4 ± 0.1	23.8 ± 2.2	14.4 ± 1.0	45.4 ± 2.2	1.43 ± 0.14
N2B^{-/-}	15.5 ± 1.5	17.4 ± 1.2 *	12.4 ± 0.8	44.8 ± 1.4	1.90 ± 0.15 *
PEVK^{-/-}	9.5 ± 1.0 *	19.0 ± 2.7	17.0 ± 0.6 *	36.8 ± 1.2 *	1.14 ± 0.10

MV AT = Beschleunigungszeit des Blutflusses an der Mitralklappe; MV DT = Dezelerationszeit des Blutflusses an der Mitralklappe; IV RT (LV) = Ruhezeit des linken Ventrikels vor Beginn der Austreibungsphase; ET (LV) = Dauer der Austreibung; MV E/A = Verhältnis der maximalen Geschwindigkeit von E zu A. N2B^{+/+} n=8; N2B^{-/-} n=9; PEVK^{-/-} n=7. *signifikant bei p < 0,05

Beim N2B Knockout fällt eine signifikant verkürzte Dezelerationszeit des Blutflusses an der Mitralklappe (MV DT) und ein signifikant erhöhtes E/A Verhältnis auf. Dies sind Anzeichen für eine diastolische Dysfunktion, hervorgerufen durch eine erhöhte Steifheit des Ventrikels.

Die Dauer der Austreibung des Blutes aus dem Ventrikel (MV ET), als ein Parameter für die systolische Funktion, ist im N2B Knockout nicht verändert.

Der PEVK Knockout zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine verkürzte Beschleunigungszeit des Blutflusses (MV AT), ein geringeres E/A Verhältnis und auch eine verkürzte Austreibungsphase mit längerer Ruhephase. All diese Faktoren werden jedoch auch durch die erhöhte Herzrate beeinflusst, so dass hier keine

verlässliche Aussage aus der Doppleruntersuchung der PEVK-defizienten Tiere getroffen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die steiferen N2B defizienten Herzen ihre geringere Größe durch ein erhöhtes „fractional shortening“ kompensieren, so dass das Pumpvolumen dem des Wildtyps entspricht.

Die steiferen, weniger kontraktilen, PEVK defizienten Herzen zeigen hingegen ein vermindertes „fraktionales shortening“ und geringeres Schlagvolumen (nicht signifikant). Sie kompensieren dieses durch eine erhöhte Herzrate.

5.3.4.2 Der N2B Knockout zeigt erhöhten diastolischen Wandstress im isoliert arbeitenden Herzen

Die Analyse der Pumpfunktion der N2B-defizienten Herzen wurde durch retrograde Perfusion des isolierten Herzens nach Langendorff in Zusammenarbeit mit Dr. Peng (WSU Pullman) durchgeführt. Die Untersuchung der PEVK-defizienten Herzen ist in Arbeit.

Nach Steigerung des passiven oder enddiastolischen Drucks (passive pressure) im linken Ventrikel antwortet das Herz mit gesteigertem entwickelten oder systolischen Druck (developed pressure) nach dem Frank-Starling-Gesetz. Durch Umrechnung der Drücke in Wandspannung wird der unterschiedlichen Herzgröße Rechnung getragen.

Um zusätzlich Einblicke in die Funktionsweise des Herzens unter Belastung zu erhalten, wurden die Herzen mit Dobutamin adrenerg stimuliert und durch Zugabe von Propranolol die adrenerge Stimulation in einem dritten Messzyklus blockiert.

Die passive Wandspannung ist in N2B defizienten Herzen im Vergleich zum Wildtyp um 89% erhöht. Dieses ändert sich auch nicht nach adrenerger Stimulation durch Dobutamin (+80%) oder durch adrenerge Blockade mit Propranolol (+75%) (Abbildung 25 B), was sich auf eine erhöhte Steifheit der Herzen zurückführen lässt. Der entwickelte systolische Wandstress hingegen ist, in unbehandelten Herzen, zwischen den Genotypen nicht verändert. Nach adrenerger Stimulation steigt der entwickelte Wandstress im N2B Knockout Herzen jedoch stärker an als im Wildtyp (+11%). Bei Steigerung des Drucks im Ventrikel um 15% wird diese Steigerung noch

deutlicher (+18%), verfehlte jedoch knapp statistische Signifikanz ($P = 0,08$). Auch nach anschließender adrenerger Blockade durch Propranolol bleibt der entwickelte Wandstress von heterozygoten und N2B-defizienten Herzen im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht (Abbildung 25 C und D).

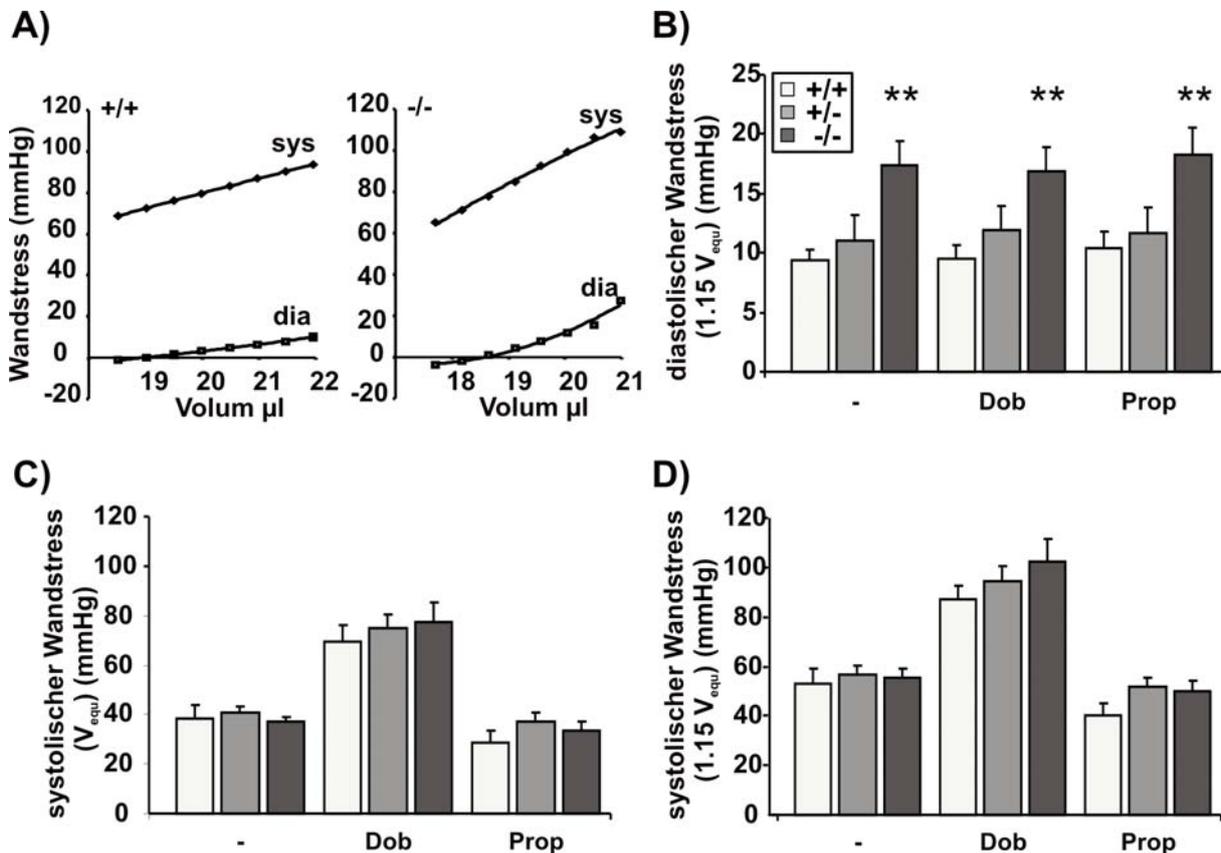


Abbildung 25: N2B-defiziente Herzen zeigen einen erhöhten diastolischen Wandstress. A) Beispiele für Wandstress Volumen Beziehungen im Wildtyp (+/+) und N2B-Knockout (-/-). Diastolischer Wandstress ist als Kasten, entwickelter / systolischer Wandstress als Kreis dargestellt. **B)** Durchschnittlicher diastolischer Wandstress von Wildtyp (+/+), Heterozygoten (+/-) und N2B-defizienten Mauserherzen (-/-) bei $V_{\text{eq}} +15\%$. Dargestellt für unbehandelte (-), Dobutamin (Dob) und Propranolol (Prop) behandelte Herzen. Der diastolische Wandstress ist unter allen Bedingungen im N2B Knockout erhöht ($P < 0,01$). **C)** Der entwickelte, systolische Wandstress bei V_{eq} und **D)** $V_{\text{eq}}+15\%$ unterscheidet sich ohne Behandlung nicht zwischen den Genotypen. Nach adrenerger Stimulation ergibt sich ein Trend zu höherem entwickelten Wandstress im N2B Knockout. Dieser verfehlte jedoch knapp die statistische Signifikanz ($P = 0,08$)

Somit konnte gezeigt werden, dass die N2B-defizienten Ventrikel eine erhöhte passive Steifheit besitzen. Die systolische Funktion ist davon unter Ruhe-Bedingungen nicht betroffen. Der N2B Knockout verhält sich hier wie der Wildtyp.

Eine erhöhte passive Wandspannung in der Diastole zieht somit nicht automatisch eine erhöhte Wandspannung in der Systole nach sich. Erst unter adrenerger Stimulation ist die systolische Funktion im N2B Knockout verändert und es zeigt sich ein Trend zu erhöhter Wandspannung.

5.3.4.3 Die Kontraktilität der N2B-defizienten Kardiomyozyten ist reduziert, die der PEVK-defizienten Kardiomyozyten erhöht

Es wird vermutet, dass Titin die Rückstellung des Sarkomers auf die Ruhelänge nach der Kontraktion vermittelt. Wie unter 5.3.3.3 gezeigt, ist die Ruhelänge nach Deletion der N2B-Region verkürzt. Es ist zu vermuten, dass Veränderungen der elastischen Eigenschaften von Titin sich auch in den kontraktilen Eigenschaften der Kardiomyozyten widerspiegeln. Um zu untersuchen, ob die Deletion von N2B oder PEVK-Region Einfluss auf die Kontraktilität der mechanisch unbelasteten Zellen besitzt, wurde diese an isolierten Kardiomyozyten untersucht. Zusätzlich zur normalen Kontraktionsmessung wurden die Zellen mit Isoproterenol-hydrochlorid (ISO) adrenerg stimuliert, um maximale Kontraktilität zu erreichen.

Die Untersuchung der Wildtyp, N2B-heterozygoten und N2B-defizienten Kardiomyozyten ergab, dass die N2B-defizienten Kardiomyozyten weniger stark kontrahieren als die Wildtypzellen. Während die Größe der untersuchten Zellen ähnlich war ($N2B^{+/+} = 123 \pm 3$; $N2B^{+/-} = 122 \pm 2$; $N2B^{-/-} = 121 \pm 3$), konnte ich feststellen, dass die prozentuale Verkürzung, das „Fraktionales shortening“ (FS) im N2B Knockout, nicht jedoch in heterozygoten Zellen, unter Normal-Bedingungen reduziert ist ($N2B^{+/+} = 7,9 \pm 0,5$; $N2B^{+/-} = 7,7 \pm 0,5$; $N2B^{-/-} = 5,1 \pm 0,4$) (Abbildung 26). Die maximale Kontraktilität ist auch unter β -adrenerger Stimulation verringert, nähert sich jedoch den Wildtyp-Zellen an ($N2B^{+/+} = 18,0 \pm 0,4$; $N2B^{+/-} = 17,0 \pm 0,4$; $N2B^{-/-} = 15,7 \pm 0,4$).

Der Zeitpunkt, an dem die maximale Kontraktion stattfindet (peak time), wird in N2B heterozygoten und N2B-defizienten Zellen schneller erreicht ($N2B^{+/+} = 0,098 \pm 0,003$; $N2B^{+/-} = 0,087 \pm 0,002$; $N2B^{-/-} = 0,086 \pm 0,002$). Auch die Kontraktionsgeschwindigkeiten (+dL/dt) und die Relaxationsgeschwindigkeiten (-dL/dt) weisen einen signifikanten Unterschied zwischen N2B-defizienten Zellen im Vergleich zu, heterozygoten- und Wildtyp-Zellen auf. Beide sind im N2B Knockout geringer als im Wildtypen (+dL/dt: $N2B^{+/+} = 170 \pm 10$; $N2B^{-/-} = 121 \pm 9$; -dL/dt: $N2B^{+/+} = 124 \pm 8$; $N2B^{-/-} = 94 \pm 8$).

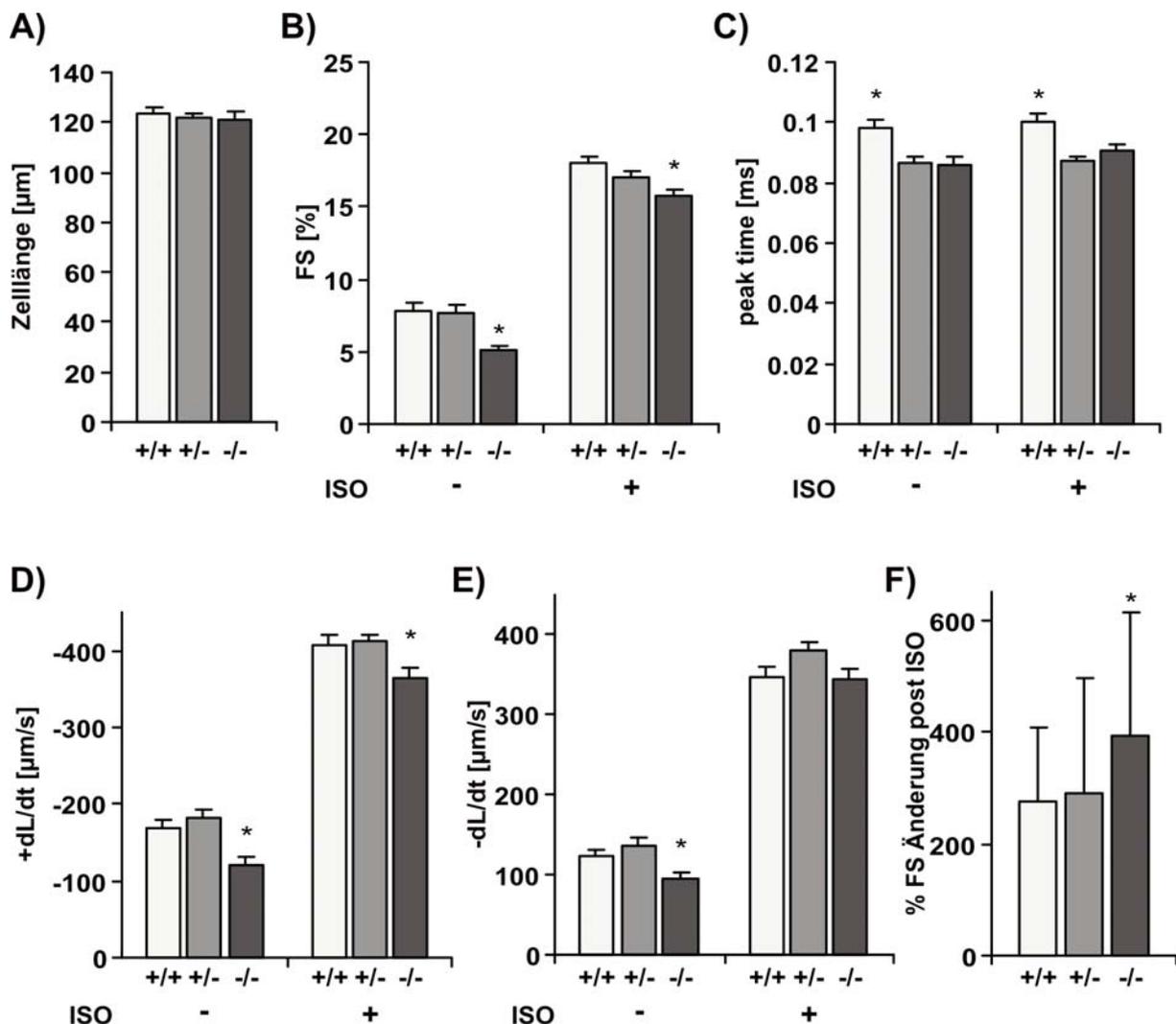


Abbildung 26: Geringere Kontraktilität der N2B defizienten Kardiomyozyten. Die kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten aus adulten (3-5 Monate) Wildtyp (+/+) (n=43 Zellen von 4 Tieren), N2B-heterozygoten (+/-) (n=47 Zellen von 4 Tieren) und N2B-defizienten Tieren (-/-) (n=50 Zellen von 7 Tieren) vor und nach adrenerger Stimulation mit 0,1 µM Isoproterenol vermessen wurde gemessen. A) Die Zelllänge der untersuchten Kardiomyozyten ist unverändert. B) Die prozentuale Verkürzung (fractional shortening) ist in N2B-defizienten Zellen geringer C) Die „peak time“ ist in N2B-Heterozygoten- und N2B-Knockoutzellen reduziert. D) Die Kontraktionsgeschwindigkeit und E) die Relaxationsgeschwindigkeit ist im unstimulierten N2B Knockout reduziert, die Relaxationsgeschwindigkeit kann jedoch im Knockout nach adrenerger Stimulation wieder die Geschwindigkeiten der Wildtypzellen erreichen. F) N2B-defiziente Kardiomyozyten zeigen eine erhöhte adrenerge Stimulierbarkeit, da die prozentuale Änderung des „fractional shortening“ nach Isoproterenol stärker steigt als in Wildtypzellen. Die Unterschiede im N2B-Knockout sind signifikant bei $P < 0.05$ (ANOVA Post Hoc Tukey HSD).

Die Reaktion der N2B-defizienten Kardiomyozyten auf β -adrenerge Stimulation mit ISO ist stärker als bei Wildtyp oder N2B-heterozygoten Zellen. Trotzdem erreichen

die N2B-defizienten Zellen unter ISO-Stimulation nicht die gleiche maximale Kontraktilität wie die Wildtypzellen.

Im Gegensatz zu den N2B-defizienten Kardiomyozyten zeigten die PEVK heterozygoten und PEVK-defizienten Kardiomyozyten eine erhöhte Kontraktilität.

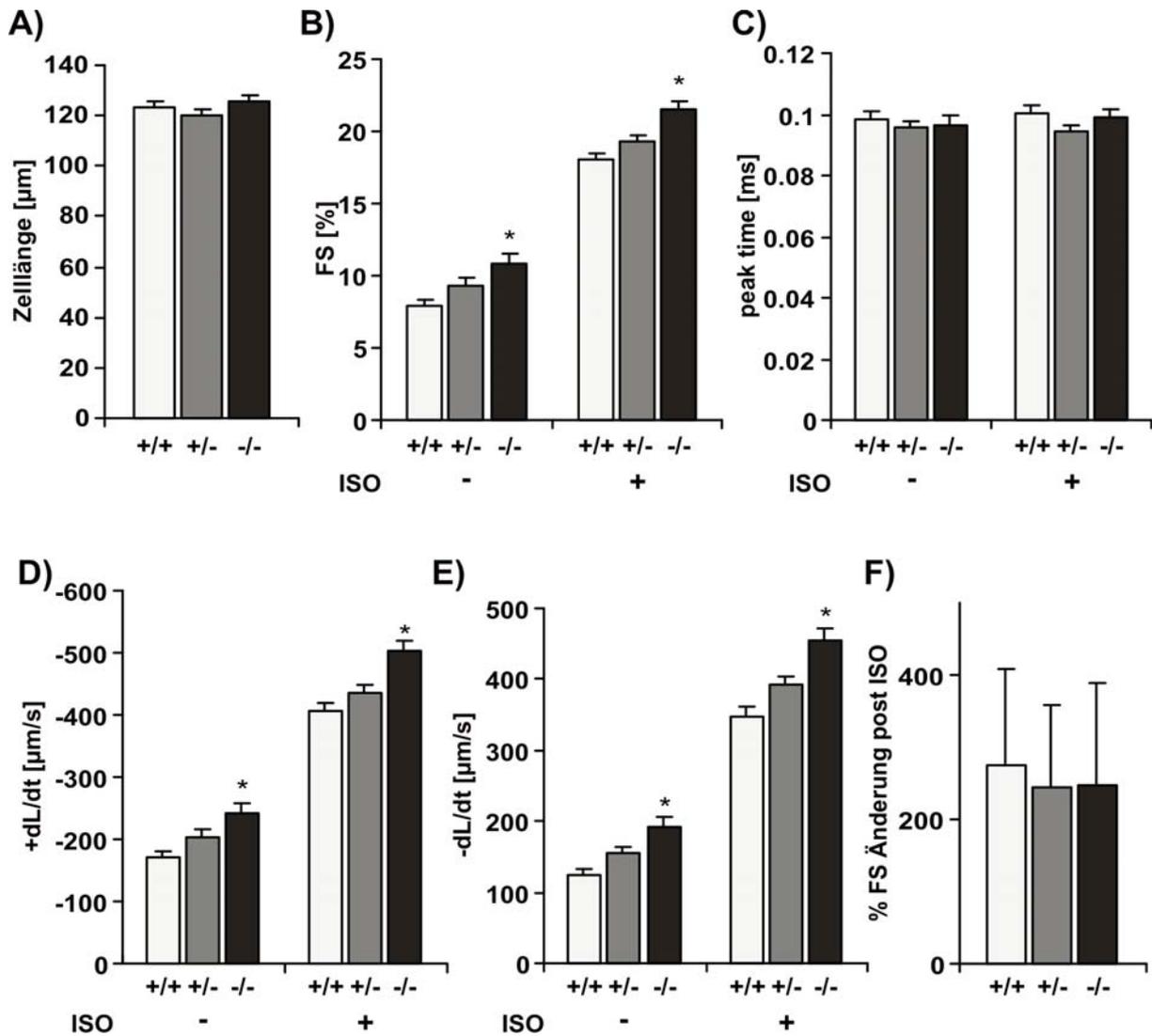


Abbildung 27: Erhöhte Kontraktilität der PEVK-defizienten Kardiomyozyten. Kardiomyozyten von adulten (3-5 Monate) Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und PEVK-defizienten (-/-) Tieren (n=43 Zellen von 4 Tieren pro Genotyp) wurden auf Ihre kontraktile Eigenschaften vor und nach adrenerger Stimulation mit 0,1 μM Isoproterenol untersucht. A) Die Zelllänge der gemessenen Kardiomyozyten ist bei allen Genotypen vergleichbar. B) Das „fractional shortening“ ist in PEVK-defizienten Kardiomyozyten, sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach adrenerger Stimulation, erhöht. C) Die „peak time“ ist zwischen den Genotypen unverändert. D) Kontraktions- und E) Relaxationsgeschwindigkeiten sind vor und nach adrenerger Stimulation in PEVK-defizienten Kardiomyozyten erhöht. F) Die prozentuale

Kontraktionsänderung nach adrenerger Stimulation ist in PEVK Knockout- und Wildtypzellen ähnlich. Die Unterschiede des PEVK Knockouts sind zum Wildtyp signifikant bei $P < 0.05$ (ANOVA post Hoc Tukey HSD).

Bei gleicher Größe der vermessenen Zellen ($PEVK^{+/+} = 123 \pm 3$; $PEVK^{+/-} = 120 \pm 2$; $PEVK^{-/-} = 125 \pm 3$) zeigten die PEVK-Knockout-Kardiomyozyten eine erhöhte prozentuale Verkürzung (FS) ($PEVK^{+/+} = 7,9 \pm 0,5$; $PEVK^{+/-} = 9,3 \pm 0,6$; $PEVK^{-/-} = 10,9 \pm 0,7$), eine höhere Kontraktionsgeschwindigkeit und eine erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit ($-dL/dt$: $PEVK^{+/+} = 169 \pm 10$; $PEVK^{-/-} = 242 \pm 14$; $+dL/dt$: $PEVK^{+/+} = 124 \pm 8$; $PEVK^{-/-} = 193 \pm 12$) (Abbildung 27).

Die erhöhten kontraktile Parameter bleiben auch nach adrenerger Stimulation im Vergleich zum Wildtyp erhalten. Die „peak time“ und die Reaktion auf Isoproterenol ist im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (peak time: $PEVK^{+/+} = 0,098 \pm 0,002$; $PEVK^{+/-} = 0,096 \pm 0,001$; $PEVK^{-/-} = 0,096 \pm 0,003$).

Der homozygote Verlust der N2B-Region wirkt sich demnach negativ auf die kontraktile Eigenschaften der Kardiomyozyten aus. Die Kontraktion ist verlangsamt und weniger stark als in Wildtypzellen.

Der Verlust der PEVK-Region wirkt sich hingegen positiv auf die kontraktile Eigenschaften der Herzzellen aus. Die Zellen können ohne das PEVK Element schneller und weiter kontrahieren.

Während sich die heterozygot N2B-defizienten Zellen eher wie der Wildtyp beim „fractional-shortening“, Kontraktion und Relaxation verhalten, nehmen die heterozygot PEVK defizienten Zellen eine Position zwischen Wildtyp und PEVK Knockout ein.

5.3.5 Einfluss der Deletionen auf Bindungspartner von Titin in der I-Bande

Um festzustellen, ob die Deletion der N2B-Region eine erhöhte Belastung für das Sarkomer darstellt, wurde die ANP RNA Menge als Marker der Stressantwort gewählt und in der Real-Time RT-PCR untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von CARP in der Real-Time RT-PCR untersucht, um die Auswirkung der N2B Deletion auf die an der N2A Region bindenden Signalmoleküle, zu untersuchen. CARP wird nach Hypertrophie hochreguliert und transloziert in den Kern. Um Hypertrophie auszulösen, wurden die Tiere acht Tage lang mit Isoproterenol β -adrenerg stimuliert.

Weiterhin wurden Bindungspartner der N2B-Region, FHL2 und α B-Crystallin untersucht. Es galt zu klären, ob sie durch die Deletionen in ihrer Lokalisation oder Expression beeinflusst werden. Hierzu wurden sie in der Immunfluoreszenzmikroskopie und im Westernblot untersucht.

Am PEVK Knockout wurde die Lokalisation des Bindungspartners und Regulators S100A1 überprüft.

5.3.5.1 Stressantwort in N2B-defizienten Herzen

Als Marker der Stressantwort wurde die RNA Menge von ANP und CARP untersucht. Da das N2B-defiziente Titin steifer ist und eine erhöhte Kontraktion in der Echokardiographie festzustellen war, wurde eine erhöhte Stressantwort erwartet. Zusätzlich zum unbehandelten Tier wurde durch Injektion von Isoproterenol für 8 Tage eine Hypertrophie induziert. Hierdurch sollte die Stressantwort maximiert werden.

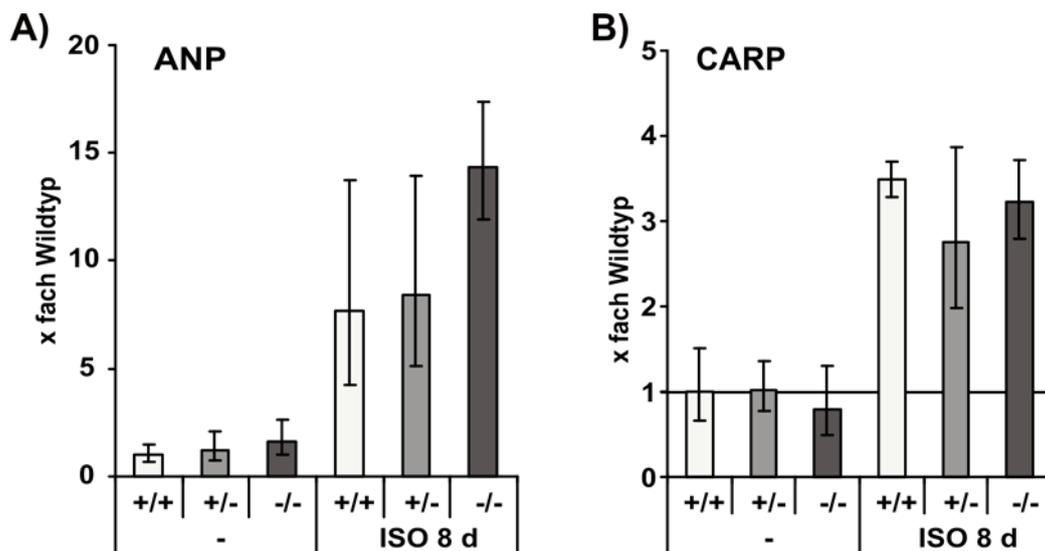


Abbildung 28: Der Stressmarker ANP ist im N2B-Knockout-Herzen erhöht. Quantitative Real-Time RT-PCR Analyse des linken Ventrikels von unbehandelten und 8 Tage adrenergisch stimulierten (20 mg/kg Isoproterenol) Wildtyp(+/+), N2B-heterozygot (+/-) und N2B-defizienten (-/-) Tieren. Die Werte wurden auf 18S RNA normalisiert, der unbehandelte Wildtyp als Referenz benutzt. A) Die ANP mRNA Menge ist im N2B Knockout vor und nach adrenerger Stimulation im Vergleich zum Wildtyp erhöht B) Die CARP mRNA Menge steigt nach adrenerger Stimulation. Es ist kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen (Triplikate von n=3 Tieren pro Genotyp).

Hierbei zeigte sich, dass der ANP Spiegel bereits im unbehandelten N2B-defizienten Tier erhöht ist (Abbildung 28 A). Nach 8 Tagen ISO Injektion und Ausbildung einer

Hypertrophie, ist der ANP Spiegel weiter erhöht. Die N2B heterozygoten Tiere zeigen jeweils nur einen leicht erhöhten ANP Wert. Aufgrund der großen Streuung der ANP Werte, sind diese Daten jedoch nicht signifikant. Auch die RNA Menge von CARP (Ankrd1), das an die N2A Region von Titin bindet und ebenfalls die Stressantwort vermittelt ist unverändert (Abbildung 28 B). Nach 8 Tagen ISO Stimulation zeigt sich, wie erwartet, eine erhöhte Expression von CARP bei Hypertrophie. Hier ist kein Unterschied zwischen den Genotypen zu verzeichnen.

5.3.5.2 FHL2 und α B-Crystallin sind trotz Deletion der N2B-Region nicht mislokalisiert

Die Lokalisation der N2B Bindungspartner FHL2 und α B-Crystallin wurde durch Konfokalmikroskopie untersucht. Die Verteilung des FHL2 Proteins wurde in isolierten Kardiomyozyten überprüft, α B-Crystallin an Kryoschnitten von PFA-fixierten Herzen, um Veränderungen durch Stress zu reduzieren.

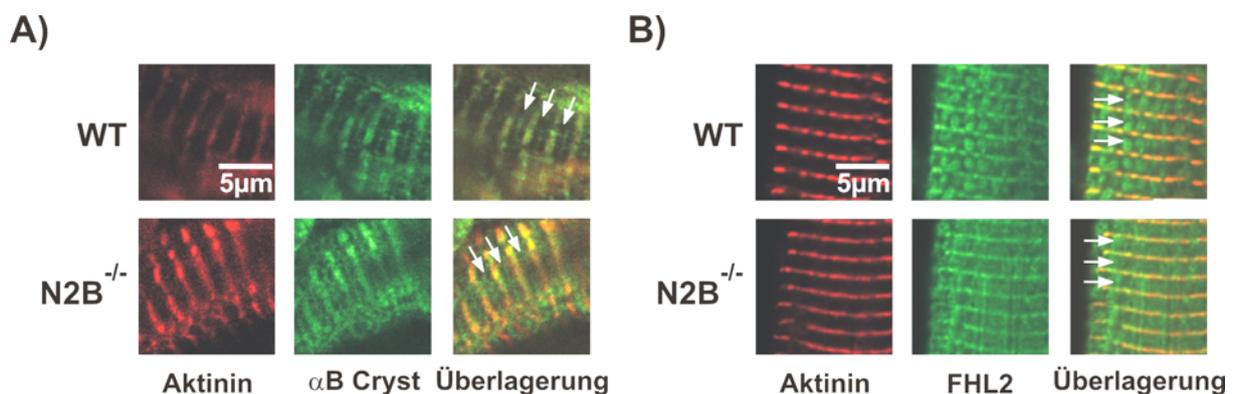


Abbildung 29: α B-Crystallin und FHL2 sind im N2B Knockout nicht mislokalisiert. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von A) Kryoschnitten von Wildtyp ($N2B^{+/+}$) und N2B-defizienten ($N2B^{-/-}$) Herzen, die mit Antikörpern gegen Aktinin (rot) und α B-Crystallin (grün) inkubiert wurden. B) $N2B^{+/+}$ und $N2B^{-/-}$ Kardiomyozyten, die mit Antikörpern gegen Aktinin (rot) und FHL2 (grün) inkubiert wurden. Sowohl α B-Crystallin als auch FHL2 zeigen im N2B Knockout ein dem Wildtyp vergleichbares Fluoreszenzmuster der untersuchten Proteine. Messbalken = 5 μ m.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen, ist die Lokalisation von FHL2 und α B-Crystallin trotz Fehlen der Titin Bindungsstelle im N2B Knockout unverändert. Es ist bei beiden Bindungspartnern ein deutliches Streifenmuster in dem Z-Scheiben / I-Banden-Bereich zu erkennen. Zusätzlich kann man für beide Proteine ein weniger starkes Signal in der M-Bande ausmachen (Abbildung 29 (A) Pfeile). Die Deletion der N2B-Region bewirkt somit keine Misslokalisierung von FHL2 und α B-Crystallin.

5.3.5.3 N2B-defiziente Herzen exprimieren weniger FHL2

Um zu klären, ob die Expression von FHL2 im N2B-Knockout verändert ist, wurde eine Real-Time RT-PCR-Analyse mit FHL2-spezifischem Amplikon und ein Western-Blot durchgeführt. Hierbei konnte ich feststellen, dass die Expression von FHL2 im N2B Knockout und in N2B heterozygoten Herzen auf RNA Ebene unverändert ist (Abbildung 30 D). Quantitative Westernblotanalyse mit einem Antikörper gegen FHL2 zeigte jedoch, dass die Proteinmenge von FHL2 in N2B-defizienten Herzen geringer als im Wildtyp ist (Abbildung 30 A und B). Die N2B heterozygoten Herzen weisen eine intermediäre FHL2 Expression auf. Das Vorhandensein der N2B-Region wirkt sich somit auf die Stabilität des FHL2-Proteins aus.

Die Proteinexpression von α B-Crystallin ist von der N2B Deletion nicht beeinflusst. Die Proteinmenge in Wildtyp, Heterozygoten und im N2B-defizienten Herzen ist vergleichbar.

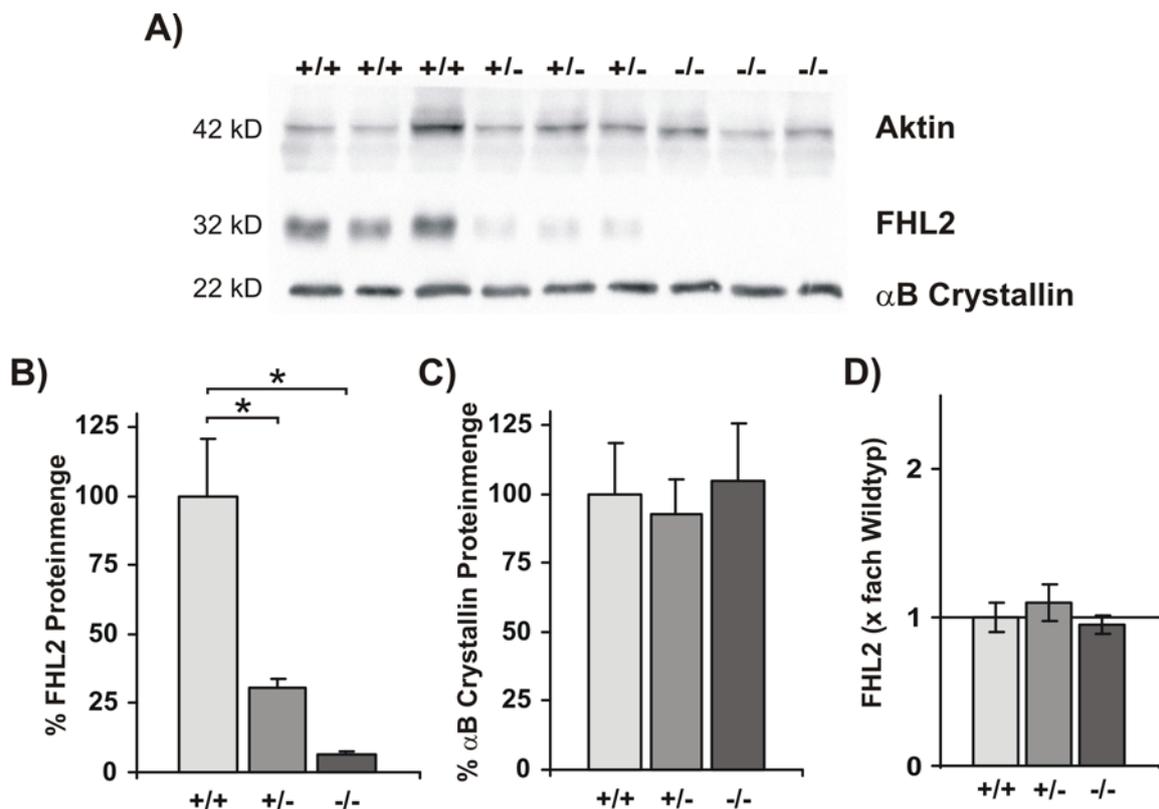


Abbildung 30: Die Proteinmenge von FHL2 ist im N2B Knockout reduziert. A) Die Titin N2B Bindungspartner FHL2 und α B-Crystallin wurden im Westernblot von wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und N2B-defizienten (-/-) linken Ventrikeln quantifiziert. Aufgetragen wurden 50 μ g Proteinlysate B) Während die Proteinmenge von FHL2 im heterozygoten linken Ventrikel reduziert und im N2B Knockout kaum noch nachweisbar ist, ist C) die Proteinmenge von α B-Crystallin zwischen den Genotypen nicht verändert. Quantifizierung von FHL2 und α B-

Crystallin (n=6 Tiere pro Genotyp) ist auf Aktin normalisiert und der Wildtyp (+/+) wurde auf 100% gesetzt. Die Unterschiede sind signifikant bei $p < 0,01$ (ANOVA post Hoc Tukey HSD). D) Die Untersuchung der RNA Expression von FHL2 wurde durch quantitative Real Time RT-PCR vom linken Ventrikel bestimmt (n=3 pro Genotyp). Sie ist unabhängig vom Genotyp.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der ANP Spiegel im unstimulierten N2B-defizienten Herzen und nach adrenerger Stimulation erhöht ist. Die CARP-RNA wird zwar nach β -adrenerg induzierter Hypertrophie hochreguliert, es besteht jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und N2B-Knockout. Weiterhin beeinflusst die Deletion der N2B-Region die Proteinmenge von FHL2, nicht jedoch dessen mRNA Menge.

5.3.5.4 PEVK-defiziente Herzen zeigen erhöhte FHL2 und α B-Crystallin Expression

Bei veränderter Dehnung der N2B-Domäne nach Deletion der PEVK-Region könnte die Interaktion von N2B mit FHL2 beeinträchtigt werden. Da, wie unter 5.3.5.3 gezeigt, die Expression von FHL2 von der N2B-Region abhängt, wurde die Proteinmenge von FHL2 in PEVK-Wildtyp, Heterozygoten und Knockout-Tieren im Westernblot untersucht.

Wie in Abbildung 31 zu erkennen, ist die Proteinmenge von FHL2 und von α B-Crystallin im PEVK Knockout erhöht. Auch die PEVK-Heterozygoten und Knockout-Tiere zeigen einen erhöhten α B-Crystallin Spiegel. Die FHL2 Menge der heterozygoten Tiere liegt zwischen Wildtyp und Knockout. Das schwächere FHL2-Signal der Wildtypen im PEVK Westernblot im Vergleich mit dem N2B Westernblot reflektiert die unterschiedlichen Entwicklungszeiten, die nötig waren, um eine Überbelichtung des starken Knockoutsignals zu verhindern.

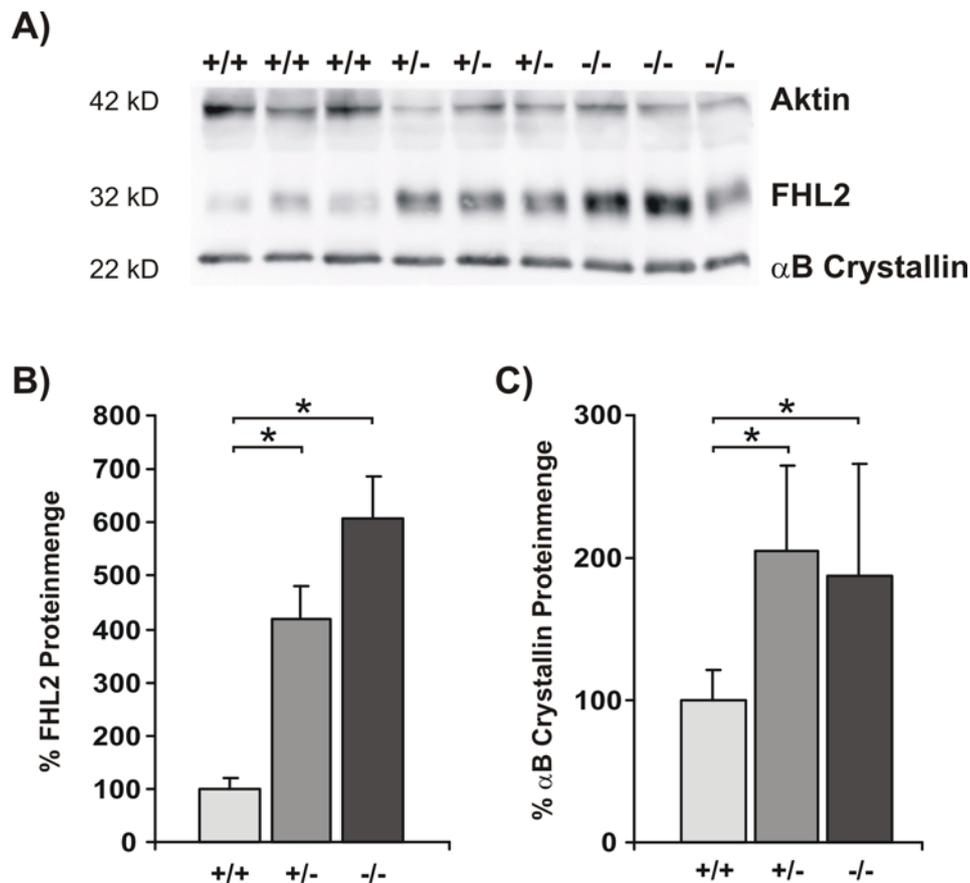


Abbildung 31: Die Proteinmenge von FHL2 und α B-Crystallin ist im PEVK Knockout erhöht. **A)** die Bindungspartner der N2B-Region von Titin wurden im Westernblot von wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und PEVK-defizienten (-/-) linken Ventrikeln quantifiziert. Aufgetragen wurden 50 μ g Protein B) Die Proteinmenge von FHL2 ist in heterozygoten Tieren erhöht in PEVK-defizienten Tieren stark erhöht. **C)** Auch die Proteinmenge von α B-Crystallin ist in heterozygoten und PEVK-defizienten Ventrikeln erhöht. Quantifizierung von FHL2 und α B-Crystallin (n=3 Tiere pro Genotyp) ist auf Aktin normalisiert und der Wildtyp (+/+) wurde auf 100% gesetzt. Die Unterschiede sind signifikant bei $P < 0,05$ (ANOVA post Hoc Tukey HSD).

5.3.5.5 S100A1 ist im PEVK Knockout normal lokalisiert.

S100A1 bindet Ca^{2+} -abhängig an die PEVK-Region und verhindert hierdurch die Interaktion von PEVK mit Aktin. Damit kann kurz vor Beginn Systole die Interaktion von Titin mit Aktin aufgehoben werden. Beide Proteine könnten so leichter aneinander entlanggleiten. Um zu testen, ob die Deletion der PEVK-Region Einfluss auf die Lokalisierung von S100A1 besitzt, wurde diese an Herzschnitten überprüft. Hierbei konnte ich feststellen, dass trotz Deletion der PEVK-Region die Lokalisierung von S100A1 nicht gestört ist (Abbildung 32).

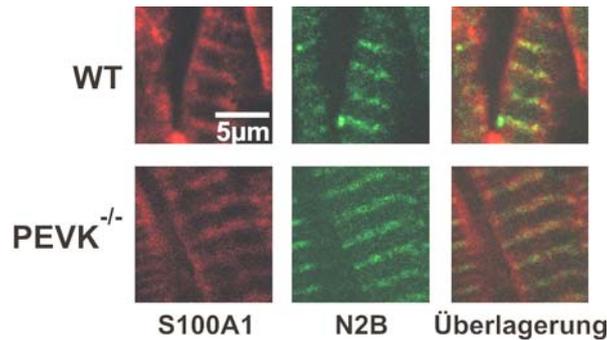


Abbildung 32: S100A1 ist im PEVK Knockout nicht mislokalisiert . Konfokalmikroskopie von Kryoschnitten des linken Ventrikels von Wildtyp (PEVK^{+/+}) und PEVK-Knockout-Tieren (PEVK^{-/-}) nach Immunfluoreszenzfärbung. S100A1 (rot) kolokalisiert mit N2B (grün) sowohl im Wildtyp als auch im PEVK-Knockout.

S100A1 bildet im PEVK Knockout wie im Wildtyp ein Streifenmuster in der I-Bande. Es müssen daher noch weitere Bindungsstellen an Titin oder weitere Bindungspartner für S100A1 in der I-Bande existieren.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei transgene Mauslinien erzeugt, um die elastischen Eigenschaften von Titin und seiner Federelemente zu untersuchen. Diesen fehlt entweder die herzspezifische N2B-Region (Exon 49) oder die im Herzen exprimierte PEVK-Region von Titin (Exons 219-225).

Die N2B defizienten Tiere entwickeln sich normal und erreichen ein dem Wildtyp vergleichbares Alter. Die Deletion des Exons 49 wurde auf genomischer, RNA und Protein Ebene bestätigt. Die Herzen des N2B-Knockouts sind kleiner als Wildtyp-Hezen. Das Titin Isoformenverhältnis wird zu Gunsten des längeren und damit schlafferen N2BA Titins verschoben, möglicherweise, um die erhöhte Steifheit des Titin-Filaments zu kompensieren. Die Struktur des Herzens und des Sarkomers ist bis auf die verkürzte Ruhelänge des Sarkomers nicht verändert. Da die Ruhelänge des Sarkomers im N2B Knockout jedoch verkürzt ist, muss Titin diese vorgeben. Nach Verlust der N2B-Region werden die PEVK und proximale IG Domänen verstärkt gedehnt.

Die erhöhte Steifheit des N2B-Knockout-Herzens konnte sowohl an isolierten Muskelfasern, als auch am intakten Herzen (isoliertes Herz und Echokardiographie) bestätigt werden. Der kleinere, steifere Ventrikel kann durch erhöhtes „fractional shortening“ (FS) sein Pumpvolumen an das des Wildtyps anzugleichen. Im isoliert arbeitenden Herzen zeigte sich, dass durch die N2B Deletion die systolische

Funktion im unbehandelten Herzen nicht verändert ist. Die Kontraktilität isolierter N2B defizienter Kardiomyozyten ist geringer als die des Wildtyps.

Die Antwort auf adrenerge Stimulation ist im N2B Knockout erhöht. Sowohl im unstimulierten Herzen, aber auch nach adrenerger Stimulation ist der ANP Spiegel erhöht. Die Stabilität des N2B Bindungsproteins FHL2 ist im N2B defizienten Herzen erniedrigt, während die Expression von α B-Crystallin nicht betroffen ist.

Auch die PEVK defizienten Tiere sind überlebensfähig, fertil und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Deletion der Exons 219-225 konnte auf genomischer und RNA Ebene bestätigt werden. Die Struktur des Herzens ist unverändert, mit geordnetem Sarkomeraufbau. Der Verlust der PEVK-Region führt zu steiferem Ventrikel und einer geringen prozentualen Verkürzung (FS) im Herzen, was teilweise durch eine erhöhte Herzfrequenz ausgeglichen wird. In isolierten Kardiomyozyten ist die Kontraktilität jedoch erhöht. Der PEVK-Interaktionspartner S100A1 ist im PEVK Knockout ebenso wenig mislokalisiert, wie die untersuchten N2B-Bindeproteine (FHL2, α B-Crystallin) im N2B Knockout. Die Expression sowohl von FHL2, als auch von α B-Crystallin ist im PEVK Knockout erhöht.

Tabelle 17: Ergebnisübersicht des N2B und PEVK Knockouts

	N2B	PEVK
Entwicklung	verkleinertes Herz	Nicht gestört
Struktur des Herzens	Nicht verändert	Nicht verändert
Struktur des Sarkomers	Verkürzte Ruhelänge, sonst nicht verändert	Nicht verändert *
Funktion des Herzens	Ventrikel steifer, kompensiert durch erhöhtes FS	Ventrikel steifer, geringes FS, kompensiert durch erhöhte Herzfrequenz
Muskelfaser	Erhöhte Steifheit	Noch nicht untersucht
Kardiomyozyten	Geringere Kontraktilität,	Erhöhte Kontraktilität,
Stressantwort	ANP erhöht	Noch nicht untersucht
I-Banden Bindeproteine	FHL2 Menge erniedrigt α B Crystallin unverändert	FHL2 Menge erhöht α B Crystallin Menge erhöht

* Untersuchung noch nicht abgeschlossen.