

Abb. 3.19: Gestörte Integration der M-Bande und A-Bande von Titin in den Tamoxifen behandelten-KO-Mäusen

Die Immunfluoreszenzfärbungen vom Herzen der Tamoxifen-behandelten KO- und Kontrolltiere zum Zeitpunkt (30d/2) zeigten, dass die M- und A-Bande von Titin keine gestreifte Färbung mehr im KO-aufwies (A, F), während die Z-Scheibe und I-Bande keine Unterschiede zwischen KO und WT zeigten (B, C, D,). Außerdem konnte eine Mislokalisation von Desmin in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren beobachtet werden (E).

Zusätzlich zu den Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Kraftentwicklung einzeln isolierter Muskelfibrillen von Tamoxifen- und Lösungsmittel-behandelten Tieren in Abhängigkeit von Ca²⁺ bestimmt. Dabei zeigte sich, dass zum Zeitpunkt (30d/2) keine Unterschiede in der Ca²⁺ abhängigen Kraftentwicklung der Muskelfibrillen von Lösungsmittel- und Tamoxifenbehandelten Tieren sichtbar waren. Daraus lässt sich schließen, dass die verminderte adrenerge Signaltransduktion in den KO-Tieren durch Veränderungen im Ca²⁺ Stoffwechsel verursacht wird (Abb. 3.20).



Abb. 3.20: Unveränderte relative Spannung der Myofibrillen in Tamoxifen behandelten Tieren nach Zugabe von Ca²⁺

Dargestellt ist die relative Spannung von einzeln isolierten Muskelfibrillen aus Tamoxifen- (Tam) und Lösungsmittel-(Veh) behandelten Tieren (30d/2) beim maximalen partiellen Druck von $pCa^{2+}=4,5$. Dabei konnten keine Unterschiede in der relativen Spannung nach Ca²⁺ Zugabe festgestellt werden (n=20).

3.2.5 Erhöhte Synthese von Stress-induzierten Proteinen in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren

Um Hinweise auf mögliche Substrate der Titinkinase oder Signalwege, in denen die Titinkinase involviert ist, auch unter dem Aspekt der Hypertrophie, zu bekommen, wurde erneut eine Proteomanalyse durchgeführt. Außerdem sollte geklärt werden, ob in den adulten Titinkinaseregion-defizienten Tieren die gleichen Proteine wie bei den nichtinduzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäusen in den ersten Wochen nach der Geburt akkumuliert werden. Dazu wurden jeweils drei Lox homozygote Cre-positive und Cre-negative Tiere mit Tamoxifen oder Lösungsmittel zwei Wochen lang injiziert. 30 Tage nach der letzten Injektion wurden die Herzen entnommen. Um auszuschließen, dass Tamoxifen zu Sekundäreffekten führt, wurden als erstes Cre-positive Lösungsmittel-behandelte Tiere mit Cre-negativen Tamoxifen-behandelten Tieren verglichen. Es konnten aber keine Unterschiede im Proteommuster nach Tamoxifeninjektion festgestellt werden.

Für die Proteomanalyse wurden Lox homozygote Cre+ Tamoxifen behandelte Tiere mit Lox homozygoten, Cre- Tamoxifen behandelten Tieren verglichen, um sicherzustellen, daß nur Tamoxifen-unabhängige Unterschiede detektiert werden. Dabei konnten 23 Proteine, die im KO verstärkt synthetisiert wurden, identifiziert werden (Abb. 3.21, Anhang Tab. 8.6). Dazu zählten Proteine, die durch zahlreiche Stressoren aktiviert werden, wie cvHsp (Hspb7), Peroxiredoxin 6 (Prdx6) und die 26S-Proteasomenuntereinheit 7 (Psmd7), sowie Sarkomerproteine wie Desmin (Des) und Vinculin (Vcl), als auch metabolische Enzyme wie Enolase 1 (Eno1) oder MPAST2 (Ehd4). Die größte Gruppe nahmen dabei erneut die Stress-induzierten Proteine ein.





Dargestellt sind die Unterschiede im Herzproteom zwischen Cre-negativen- (grün) und Cre- positiven (rot) Tamoxifen-induzierten KO-Tieren. Vermehrt synthetisierte Proteine im KO sind im Dualbild rot, vermindert synthetisierte Proteine grün. Die kursiv gedruckten Proteine sind nicht signifikant verändert (P>0,1), traten aber auch bei den nichtinduzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren auf (n=3).

Im Vergleich zur Herzanalyse der 30 Tage alten nichtinduzierbaren KO-Mäuse wurde der Großteil der Protein in beiden Analysen im KO akkumuliert. Das deutet darauf hin, dass in den Herzen der KO-Tieren unabhängig vom Alter und der Entwicklung die gleichen Signalwege nach der Deletion der Titinkinaseregion aktiviert werden. Viele der akkumulierten Proteine im KO werden durch die Proteinkinasen PKCδ und PKCε aktiviert (Tab.3.1). Beide Proteinkinasen wurden bereits mit Hypertrophie-Signalwegen in Verbindung gebracht.

Gen	Protein	Tkr-Q	Tkr-H	Mcm-H	ΡΚϹε	РКСб
Struktur-	und Zytoskelettpro	teine				
Des-1	Desmin	1,61			х	
Des-2	Desmin	1,88	1,55	1,57	Х	
Vcl-1	Vinculin	3,18	1,5	1,77	Х	
Vcl-2	Vinculin	2,91	2,53	1,63	Х	
Stress-ak	tivierteProteine					
CryaB-1	alphaB-Crystallin	7,97	1,82	2,14	х	
Hspb1-2	Hsp 25/27	6,0	1,88	2,63	Х	Х
Hspb1-3	Hsp 25/27	4,68	1,86		Х	Х
Hspb1-1	Hsp 25/27	2,65		1,86	Х	Х
Hspb6	Hsp20		2,3			Х
Prdx6-1	Peroxiredoxin 6	1,854		2,34		Х
Metabolis	sche Enzyme					
ApoA1-1 Eno1-1	Apolipoprotein Al alpha Enolase 1	1,55		1,63	х	Х
Signalpro	oteine					
Myoz2-1	Myozenin 2			2,33	х	
Myoz2-2	Myozenin 2			1,78	Х	

Tab. 3.1: PKCδ und PKCε abhängige Proteine, die in den Mcm- und Titinkinaseregion-KO-Tieren im Vergleich zur Kontrolle unterschiedlich synthethisiert wurden

Dargestellt sind alle Proteine und deren Ratios, die in den 2D-Analysen von Titinkinaseregion- (Tkr, Q=Quadriceps, 30d, H=Herz, 34d (n=4)) und induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäusen (Mcm, H=Herz, 30d/2 (n=3)) zwischen KO und Kontrolle unterschiedlich synthetisiert wurden und bereits als Substrate der Proteinkinasen PKCδ und PKCε in der Literatur beschrieben wurden.

3.2.6 Expressionsanalyse der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tiere

Durch die 2D-Analyse von den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäusen konnten viele PKCδ- und PKCε-abhängige Proteine identifiziert werden, die im KO akkumuliert wurden. Das weist auf eine erhöhte Aktivierung beider Proteinkinasen hin. Aufgrund des Hypertrophie-Phänotyps der Titinkinaseregion-defizienten Tiere wurden die RNA-Mengen von PKCδ- und PKCε, sowie anderer Hypertrophie-assoziierte Proteine, wie ANP, BNP, RhoA und Gata4 mit Real Time PCR überprüft. Für die Analyse wurden je drei Lox homozygote, Cre+ Tamoxifen- oder Lösungsmittel-behandelte Tiere verwendet. Dabei zeigte sich, dass die RNA von PKCδ 2,1-fach in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren hochreguliert, während die PKCε-RNA 0,5-fach runterreguliert war. Die Hypertrophiemarker ANP und BNP wurden im KO 10-fach bzw. 4-fach stärker exprimiert als in den Kontrolltieren. Die anderen Hypertrophie-involvierten Proteine GATA4 und RhoA zeigten keine Unterschiede in der m-RNA Menge zwischen KO- und Kontrolltieren (Abb. 3.22 A).

Die Versuche am isolierten Herzen (siehe 3.3.3) weisen auf eine beeinträchtigte Ca²⁺-Homöostase in den Tamoxifen behandelten-KO-Tieren hin. Daher wurden die RNA-Mengen wichtiger Calciumregulatoren des sarkoplasmatischen Retikulums, wie Phospholamban, Ltype Calcium Channel (LTCC) und Serca2 quantifiziert. Es zeigte sich, dass alle drei in den KO-Tieren runterreguliert wurden, wobei die RNA von Serca2 am stärksten betroffen war (0,3-fach runterreguliert)(Abb. 3.22 B).

Neben der RNA-Analyse von Hypertrophie- und Calciummarkern wurde die Expression aller M-Banden-bindender Proteine von Titin überprüft, deren Bindungsstelle in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren deletiert wurde. Dabei zeigte nur Murf2, das indirekt über Murf1 neben der Titinkinase bindet, eine verminderte Expression im KO. Die RNA-Mengen von Myomesin, Calmodulin 1, FHL2, Murf1 und der Titinkinasesubstrate Tcap, p62 und Nbr1 waren hingegen unverändert (Abb. 3.22 C).

Dennoch wurde die Expression einiger Gene getestet, die in Signalwegen stromabwärts dieser M-Banden-bindenden Proteine eine Rolle spielen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die RNA von CSRP3, welches für das Muscle LIM Protein (MLP) codiert, im KO leicht hochreguliert war (1,7-fach). MLP bindet an das Titinkinasesubstrat Tcap und ist in Dehnungssignalwegen, sowie Regenerierungsprozessen nach Muskelverletzungen oder Infarkt involviert (Barash et al., 2005; Knoll et al., 2002). Desweiteren war Presenilin 2, das an FHL2 bindet, in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren runtereguliert, obwohl FHL2 keine Unterschiede im Expressionslevel zeigte (Abb. 3.22 D).

Die RNA-Analyse unterschiedlicher Domänen von Titin zeigte, dass die Expression der Titinkinase (Exon 357/358) in den KO-Tieren stark runterreguliert (0,1-fach gegenüber den Kontrollen) war, während der Bereich hinter der Kinaseregion (M-Banden Exon 6) sowie der N-Terminus (Z1/Z2), der in die Z-Scheibe des Sarkomers integriert, normal exprimiert wurde (Abb. 3.22 E).



0

WYOT OST N Can the Work WURL TOR WURL

0,0

PLB

LTCC

Serca2



Abb. 3.22: Expressionsanalyse der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäuse

Für die Expressionsanalyse wurden Tamoxifen- oder Lösungsmittel-behandelte Tiere verwendet (30d/2). Alle Proben wurden doppelt bestimmt und mit der $\Delta\Delta C_T$ Methode ausgewertet. Dargestellt sind die Expressionlevel der KO-Tiere bezogen auf die Kontrolltiere, wobei ein Wert von 1 der Expression der Kontrolltiere entspricht. Expressionwerte <0,5 wurden als runterreguliert, >1,5 als hochreguliert eingestuft. Demnach wurden ANP, BNP, CSRP3 und PKC6 im KO verstärkt exprimiert, während Presenilin2, Serca2, Murf2 und das Titinkinaseexon (357/358) reprimiert wurden. (A) zeigt die Expressionslevel verschiedener Hypertrophiemarker, (B) Calciumassoziierter Proteine, (C) M-Banden bindender Proteine, (D) Proteine die im Signalweg stromabwärts der M-Banden bindenden Proteine liegen und (E) Titinkinasedomänen (n=3). * P<0,05; ** P<0,01

3.2.7 Proteinanalyse der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tiere

Ein Großteil der Proteine aus den Expressionsanalysen wurde zusätzlich durch Western Blot Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, daß PKCδ auch auf Proteinebene in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren gegenüber den Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren hochreguliert war, was die Ergebnisse der 2D-Analyse unterstützt. PKCɛ hingegen war in der RNA-Analyse in den KO-Tieren leicht runterreguliert, zeigte aber in der Western Blot Analyse keine Unterschiede zwischen KO und Kontrolle. Das könnte z. B. auf eine hohe Halbwertszeit des Proteins zurückzuführen sein, so dass sich die verminderte Expression des Gens verzögert auf die Proteinmenge auswirkt. Unterschiede zwischen Protein- und RNA-Menge wurden auch bei RhoA festgestellt, das in der RNA-Analyse unverändert war, während die Proteinmenge im KO höher war, was z.B. durch eine höhere Stabilität der m-RNA erklärt werden könnte (Abb. 3.23 A). Neben RhoA, PKCõ und PKCɛ wurden außerdem Foxo1 und Myostatin im Western Blot überprüft. Beide sind negative Regulatoren der Hypertrophie (Reisz-Porszasz et al., 2003; Langley et al., 2002; Brunet et al., 1999). Sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene trat Foxo1 marginal vermindert im KO auf. Myostatin, dessen Expression von Foxo1 reguliert wird (Allen und Unterman, 2006), war ebenfalls auf Proteinebene in den Tamoxifen injizierten Tieren reduziert (Abb. 3.23 A).

Die Calcium-assoziierten Proteine Phospholamban (PLB) und Serca2 waren sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren leicht runterreguliert, während LTCC keine Unterschiede zwischen KO- und Kontrolltieren im Western Blot zeigte (Abb. 3.23 C).

Bei den M-Banden-bindenden Proteine wurden Myomesin, Murfl, Calpain 3, p62, Tcap, Calmodulin 1 (CaM1) und FHL2 überprüft. Obwohl die Bindungsstelle dieser Proteine in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren fehlt und p62 und Tcap als Substrate der Titinkinase beschrieben wurden, konnten keine Unterschiede in der m-RNA Menge zwischen KO und Kontrolle festgestellt werden. Auf Proteinebene aber war Murfl leicht hoch- und Calmodulin 1 leicht runterreguliert in den KO-Tieren (Abb. 3.23 B).

Die veränderten Proteinmengen von Serca2, Phospholamban, Murf1 und Calmodulin 1 in den Tamoxifen-behandelten KO-Tieren 30 Tage nach zwei Injektionsrunden könnte durch Sekundäreffekte der beginnenden Hypertrophie verursacht werden. Um möglichst frühe Veränderungen zu dokumentieren, wurden diese Proteine zusätzlich 5, 10 und 30 Tage nach einer Injektionsrunde im Western Blot überprüft. Dabei zeigte sich, dass Serca2 und PLB in den Tamoxifen-behandelten Tieren bereits 5 Tage nach einer Injektionsrunde vermindert synthetisiert wurden, während Murf1 und CaM1 bis 30 Tage nach einer Injektionsrunde keine Unterschiede in der Proteinmenge zeigten (Abb. 3.23 D).



Abb. 3.23: PKCδ und Murf1 akkumulieren im Herzen der Tamoxifen-behandelten Tiere während Myostatin und Ca²⁺ regulierende Proteine vermindert synthetisiert wurden

Für die Western Blot Analyse der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäuse wurden Tamoxifen- Tam(30d/2) und Lösungsmittel- behandelte Tiere Veh(30d/2) verwendet. (A) Hypertrophiemarker, (B) M-Banden bindende Proteine, (C) Calcium-assoziierte Proteine. Dabei zeigte sich, dass die Proteinmenge von Murf1, RhoA und PKCδ in den Tamoxifen-behandelten Tieren erhöht war, während Serca2, Phospholamban (PLB), Myostatin, Calmodulin 1 (CaM1) und Phospho-Troponin vermindert synthetisiert wurden. (D) Die Proteinmenge von Serca2- und PLB ist bereits 5 Tage nach einer Injektionsrunde in den Tamoxifen-behandelten Tieren reduziert, während Murf1 und CaM1 bis zum Zeitpunkt (30d/1) keine Unterschiede zeigen.

3.2.8 Mislokalisation von PKCô in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren

Ergänzend zu den Ergebnissen der Transkriptom- und Proteomanalysen wurde die Lokalisation von Calmodulin 1, PKCδ und PKCε mit Immunfluoreszenzfärbungen überprüft. PKCδ zeigte in der Immunfluoreszenz eine Membranlokalisation im WT, die in den Titinkinaseregion-defizienten Zellen nicht mehr auftrat (Abb. 3.24 B). Für PKCE wurde bereits eine Membranlokalisation beschrieben, die durch Murfl verhindert werden kann, da es an den Rezeptor der PKCɛ, Rack 1 bindet (Arya et al., 2004). Die Membranlokalisation in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren konnte aber nicht bestätigt werden. Der verwendete PKCE-Antikörper zeigte ein gestreiftes Färbemuster und eine Kolokalisation mit Aktinin, was für eine Bindung an die Z-Scheibe des Sarkomers spricht. Zwischen KO und Kontrolle traten keine Unterschiede auf (Abb. 3.24 C). Es wurde auch die Lokalisation von Troponin I überprüft, da PKCe die Kontraktilität des Sarkomers durch Bindung an Troponin beeinflussen kann (Roman et al., 2004; Westfall und Borton, 2003). Auch hier waren keine Unterschiede zwischen KO und Kontrolle sichtbar (Abb. 3.24 D). Calmodulin 1, das in den Tamoxifen-behandelten Tieren vermindert synthetisiert wurde, lokalisierte in den Immunfluoreszenzfärbungen an der Z-Scheibe, zeigte aber keine Unterschiede zwischen KO und Kontrolle (Abb. 3.24 A).



Abb. 3.24: Veränderte Lokalisation von PKCô in den Tamoxifen-behandelten Mäusen

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzfärbungen von Tamoxifen-(Tam) behandelten KO- und Kontrolltieren (Veh) (30d/2). Die Ca²⁺-abhängigen Proteine Troponin I (D) und Calmodulin 1 (A) zeigten keine Unterschiede in der Lokalisation, ebenso wie PKC ε (C). PKC δ lokalisierte in den Lösungsmittel-behandelten Tieren an der Membran, während es in den Tamoxifen-behandelten Tieren eine diffuse Färbung aufwies (B).

3.2.9 Erhöhte Serca2 Aktivität in den Titinkinaseregion-KO-Tieren

Die Ergebnisse der isolierten Herzversuche zeigten, dass die Ca²⁺-Signaltransduktion in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren gestört ist. Desweiteren konnte eine Verringerung der RNA- und Proteinmenge der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase Serca2 und deren Regulator Phospholamban in den Tamoxifen-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Um zu prüfen, inwieweit die verringerte Proteinmenge von Serca die Calcium-Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum beeinflusst und somit zu der reduzierten adrenergen Signaltransduktion in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren führt, wurden Serca Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde der Oxalat-stimulierte Einbau von

radioaktivem ⁴⁵Ca²⁺ in den sarkoplasmatischen Vesikel durch Serca bestimmt. Es zeigte sich überraschenderweise, dass sowohl bei niedrigen (0,346 μ mol/l), als auch bei hohen Konzentrationen (3,68 μ mol/l) an freiem ⁴⁵Ca²⁺ die Serca-Aktivität in den Titinkinaseregion-KO-Tieren Tam(30/2) höher war, als in den Kontrolltieren Veh(30/2). Dieser Effekt wurde durch Zugabe von Rutheniumrot, das den Ausstrom von Ca²⁺ aus den SR-Vesikeln durch Hemmung des Ryanodinrezeptors verhindert, weiter verstärkt (Abb. 3.25).





Dargestellt ist der Einbau von radioaktiven ⁴⁵Ca/mg Protein in das sarkoplasmatische Retikulum bei niedrigen (0,346 µmol/l) und hohen (3,68 µmol/l) freien ⁴⁵Ca²⁺-Konzentrationen. Durch Zugabe von Rutheniumrot bei hohen (3,68 µmol/l) ⁴⁵Ca²⁺-Konzentrationen kann die Aufnahme zusätzlich gesteigert werden. Die Tamoxifenbehandelten Tiere (Tam (30d/2)) zeigen sowohl bei niedrigen, als auch bei hohen ⁴⁵Ca²⁺-Konzentrationen und bei Zugabe von Rutheniumrot eine erhöhte Serca Aktivität gegenüber den Lösungsmittel- (Veh) behandelten Kontrollen (n=6). * P<0,05; ** P<0,01

3.3 Charakterisierung der Titin-N2A Domäne in Mdm KO-Mäusen

Die Muskeldystrophie/Myositis (Mdm) Mutation wird durch eine Deletion von 83 Aminosäuren und eine Insertion eines LINE Retrotransposons in der N2A Region von Titin verursacht, wobei die Bindungsstelle für die Cysteinprotease Calpain 3 entfernt wird. Homozygote KO-Mäuse entwickeln ab der 2.-3. Lebenswoche eine schwere Muskelschwäche der distalen und proximalen Skelettmuskel und sterben im Alter von zwei Monaten, wobei das Herz nicht beeinträchtigt ist. Es konnte bereits gezeigt werden, daß Calpain 3 an der Myofibrillogenese und dem Sarkomeraufbau beteiligt ist und die Proteolyse verschiedener Muskelproteine induziert (Ojima et al., 2005; Poussard et al., 1996). Calpain 3 bindet zusätzlich zur N2A-Region auch an die Z-Scheibe und M-Bande von Titin. In den Titinkinaseregion-defizienten Mäusen wird der Bereich der M-Bande hinter der Titinkinase, der die Calpain 3 Bindungsstelle enthält, nicht mehr in das Sarkomer integriert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Mislokalisation von Calpain 3 den Phänotyp beeinflußt. Der Krankheitsverlauf in beiden Stämmen ist sehr ähnlich, obwohl unterschiedliche Teile Titins deletiert wurden. Durch 2D-Gelelektrophorese sollte daher geklärt werden, ob ähnliche Veränderungen im Quadriceps-Proteommuster der Mdm- und der Titinkinaseregion-KO-Tiere auftreten.

3.3.1 Vermehrte Synthese von Stress-induzierten Proteinen in Mdm-Mäusen

Für die Proteomanalyse der Mdm-Tiere wurden je 4 Mdm- KO und als Kontrolle WT-Geschwistertiere im Alter von 32 Tagen verwendet. Um nur die Geschlechts-unspezifischen Unterschiede zu detektieren, wurden sowohl Männchen als auch Weibchen analysiert. In den KO-Tieren wurden 26 Proteine gegenüber dem WT vermehrt synthetisiert (Abb. 3.27, Anhang Tab. 8.7). Dabei bildeten Stress-induzierte Proteine wie αB-Crystallin (CryaB), Hsp25/27 (Hspb1) und Superoxiddismutase 1 (Sod1) die größte Gruppe. Desweiteren wurden Sarkomerproteine wie Desmin (Des) und Tubulin (Tuba1/2/7), sowie metabolische Enzyme, wie Aldehyddehydrogenase 2 (Aldh2), Enolase 1 (Eno1) und Isocitratdehydrogenase 3a (Idh3a) und Signalproteine, wie Gdi3 und Myozenin 1 (Myoz1) im KO akkumuliert. Der Vergleich der Proteomdaten von den Titinkinaseregion- und Mdm-KO-Tieren zeigte, dass der Großteil der Proteine (19) in beiden KO-Stämmen akkumuliert wurde. Dies könnte bedeuten, dass beide Titindeletionen, obwohl sie in unterschiedlichen Domänen liegen, zur Funktionsbeinträchtigung des Gesamttitins führen.

	Met	abolism	us			Stress	
	rot	grün	dual		rot	grün	dual
Aldh2-2	100	$q^{(2)}$	*	Car3		٠	•
Apobec2	-		-	Cops4	œń.	ja.	-
Cs		-	6	CryaB			
DIst-1		۰.	• ¥	Hspb1-1	٠		
Eno1-2	*	+	٠	Hspb1-2	٠		٠
Hadhb	٠			Hspb7	۹.		- k.
ldh3a-2	•	• -	💣 🥙	Kbtbd10	+		-
Ldh2-1		-	A.	Mb-1		٠	٠
Pdhb		÷.		Ppia-1	10	-	10
Pgam2-2	ţ		-	Sod1	۰	+	٠
	S	arkome	r		\$	Sonstige)
Des-1/2	CE.	de la		Arhgdia/Myl3	150		-
Tuba1/2/7			•	LmnA-1		-•	40
	Si	gnalwe	g				
Gdi3		- 9 -					
Myoz1-4			· · ·				

Abb. 3.27: Akkumulation von 27 Proteinen im Quadriceps der Mdm-KO-Mäuse

Dargestellt sind die Unterschiede im Quadricepsproteom zwischen 32 Tagen alten WT- (grün) und Mdm-KO-Tieren (rot). Dabei traten 26 Proteine im KO in höheren Mengen (rot im Dualbild) auf als im WT. Die kursiv gedruckten Proteine sind nicht signifikant verändert (P>0,1), traten aber auch im Titinkinaseregion-KO auf (n=4).

3.3.2 Unveränderte Calpain 3 Proteinmenge in Titinkinaseregion- und Mdm-KO-Mäusen

Um zu prüfen, ob veränderte Calpain 3 Konzentrationen in den Titinkinaseregion- und Mdm-KO-Tieren den ähnlichen Phänotyp hervorrufen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, das die Calpain 3 Proteinmenge im Quadriceps der Mdmund Titinkinaseregion-KO-Tiere gegenüber dem Wildtyp nicht verändert war (Abb. 3.28).



Abb. 3.28: Proteinmenge von Calpain 3 ist in Mdm und Titinkinaseregion-KO-Tieren unverändert

Die Western Blot Analyse zeigt, dass die Proteinmenge von Calpain 3 in den Mdm- und Titinkinaseregion-KO-(Tkr) Tieren unverändert gegenüber dem WT ist. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

3.3.3 Unveränderte Titinstruktur in den 32 Tage alten Mdm-KO-Tieren

Die Gemeinsamkeiten zwischen den Titinkinaseregion- und Mdm-KO-Tieren in der Proteomanalyse könnten auch durch Strukturveränderungen des Sarkomers hervorgerufen werden, da beide Stämme eine Muskelatrophie entwickeln. Überraschenderweise konnten aber in den Mdm-KO-Tieren zum Zeitpunkt der Proteomanalyse (32 Tage) keine Veränderungen der M-Bande, A-Bande und Z-Scheibe von Titin mit Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden, während in den Titinkinaseregion-KO-Tieren die vermehrte Synthese von Stress-, Sarkomer- und metabolischen Proteinen mit Veränderungen in der Sarkomerstruktur einherging (Abb. 3.29).



Abb. 3.29: Unveränderte Struktur von Titins M-Bande, A-Bande und Z-Scheibe in den Mdm-KO-Tieren Immunfluoreszenzfärbungen der M-Bande (Titin A168-170, Titin M8/9), der A-Bande (Titin T3) und der Z-Scheibe von Titin in 32 Tage alten Mdm-KO-Tieren.

3.4 Identifizierung neuer Interaktionspartner der Titinkinase

Bisher sind nur wenige Substrate der Titinkinase bekannt. Mayans konnte zeigen, dass das Z-Scheiben Protein Telethonin (Tcap) während der Myofibrillogenese durch die Titinkinase phosphoryliert wird (Mayans et al., 1998). Kürzlich erschienende Daten weisen aber darauf hin, daß Tcap erst nach der Myofibrillogenese exprimiert wird (Weinert et al., 2006).

Zwei weitere Substrate der Titinkinase, Nbr1 und p62, wurden 2005 von Lange und Kollegen identifiziert (Lange et al., 2005). Patienten, bei denen die Nbr1 Bindungsstelle mutiert ist, entwickeln eine Muskelschwäche in den oberen und unteren Extremitäten ohne Beteiligung des Herzens. Das impliziert, dass die Titinkinase in unterschiedliche Signalwege, mit unterschiedlichen Substraten im Herzen und im Skelettmuskel involviert ist. Weder für Tcap noch für Nbr und p62 konnte bisher eine direkte Verbindung zur adrenergen Signaltransduktion nachgewiesen werden, welche die Veränderungen im Calcium-Stoffwechsel in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren erklären könnten. Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit neue Substrate der Titinkinase durch unterschiedliche Interaktionsstudien in Prokaryoten und Eukaryoten zu identifizieren.

3.4.1 Yeast Two Hybrid-Screen

Für den Yeast Two Hybrid-Screen (Y2H) wurde die katalytische Domäne von Titin und eine mutierte Form als Köderproteine verwendet (Abb. 3.30). Strukturanalysen der Titinkinase zeigten, daß die Aktivierung der Kinase über ein Tyrosinrest in der P+1 Schleife erfolgt. Die Mutation dieses Tyrosinrestes Y170 zu Glutamat E170 verhindert die Inaktivierung und täuscht die Phosphorylierung der katalytischen Domäne vor (Mayans et al., 1998).



Abb. 3.30: Mutation der katalytischen Domäne von Titin

Die Mutation zweier Basen in der P+1 Schleife der katalytischen Domäne von Titin führt zu einem Aminosäureaustausch von Tyrosin (Y170) zu Glutamat (E170). Dadurch wird die Phosphorylierung des Tyrosinrestes vorgetäuscht, so daß die Autoinhibierung der Titinkinase aufgehoben wird.

Der AH109-Hefestamm mit der mutierten oder unmutierten katalytischen Domäne von Titin wurde mit dem Y187 Hefestamm, der eine embryonale Maus-Herzbibliothek (E11) enthielt, verpaart. Die positiven Klone wurden auf 4-fach defizienten Platten (-His, -Leu, -Ade, -Trp) + α -X-gal selektiert und anschließend nochmal kontrollverpaart. Die verbleibenden positiven Interaktionspartner sind in Tab. 3.2 zusammengefaßt. Es konnten 18 positive Klone identifiziert werden, wobei Eef1a2 (4x), Arid2 (2x) und Hsp1beta (6x) mehrmals identifiziert wurden. Ein Vergleich der Domänenstruktur der positiven Klone zeigte, das alle unterschiedliche Domänen aufwiesen, so daß keine Präferenz der Titinkinase für eine bestimmte Domäne festgestellt werden konnte.

Köderprotein	Gen	Protein	Domänen	NCBI-Nummer
cd	Acol	aconitase 1, mitochondrial		gi 26103097 dbj AK085951.1
cdmut	Amfr-predicted	Autocrine motility factor receptor		gi 62664839 ref]XP_341645.2
cdmut	Ankrd12	ankyrin repeat domain 12	Ankrd12 domain	gi 51593624 gb BC080825.1
cdmut	Arid2	AT rich interactive domain 2		gi 28202013 ref NP_780460.1
cd	Arid2	AT rich interactive domain 2		gi 28202012 ref]NM_175251
cdmut	Cct7	chaperonin containing TCP1, subunit 7	Cpn60-TCP1	gi 62630157 gb AAX88902.1
cd	Eef1a2	euk. transl. elongation factor 1 alpha 2 (3 Klone)	GTP-EFTU-D3	gi 15805031 ref]NP_284925.1
cdmut	Eef1a2	euk. transl. elongation factor 1 alpha 2	GTP-EFTU-D2	gi 51873060 ref]NP_034236.1
cdmut	Enol	enolase1 alpha non-neuron		gi 26324300 dbj BAC24987.1
cd	Gnb211	G protein beta subunit like	WD40	gi 475012 dbj BAA06185.1
cdmut	Gree 10	gene rich cluster, C10 gene (Grcc10)		gi 7305106 ref NM_013535.1
cdmut	Hmgn2	high mobility group nucleosom. bind. dom 2		gi 38566079 gb BC062183.1
cd	Hnrpll	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like		gi 62286942 sp Q921F4
cd	Hsp90ab1	heat shock protein 1, beta (2 Klone)	06dSH	gi 40556608 ref]NP_032328.2
cdmut	Hsp90ab1	heat shock protein 1, beta (4 Klone)	06dSH	gi 57242925 gb AAH88985.1
cdmut	Hspca	Heat shock protein 1, alpha	06dSH	gi 54673763 gb AAH85120.1
cdmut	Lman2	Lectin, mannose-binding 2	lectin leg-like	gi 33244015 gb AAH55327.1
cdmut	LOC14433	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gp-dh-N/C	gi 62533192 gb AAH93508.1
cd	Mab2111	mab-21-like 1		gi 26081236 dbj AK029239.1
cdmut	MFH-1	mesenchyme fork head-1 protein		gi 1869968 emb Y08222.1
cdmut	mKIAA0346	mKIAA0346, Transkriptionsfactor Jumonji		gi 37359906 dbj BAC97931.1
cdmut	mKIAA1931	mKIAA1931 protein		gi 50511191 dbj BAD32581.1
cd	Ndufv2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit		gi 20178012 sp Q9D6J6
cdmut	Polr2e	Polymerase (RNA) II polypeptide E	RNA-pol-Rpb5-N	gi 28374319 gb AAH45521.1
cd	Psme3	proteasome activator subunit 3	PA28-alpha, beta	gi 54695640 gb AAV38192.1
cd	RP23-180B18.4	p116Rip, Rho interacting protein 3		gi 56205309 emb CAI24301.1
cd	Rsrc1	arginine/serine-rich coiled-coil 1, mRNA		gi 52789289 gb BC083123.1
cdmut	Sap130	mSin3A-associated protein 130		gi 38648728 gb AAH63075.1
cdmut	Sri	sorcin, mRNA		gi 41388997 gb BC065790.1
cdmut	Stau1	Staufen (RNA binding protein) homolog 1	DSRM	gi 6755674 ref NP_035620.1
cdmut	Tsen34	TRNA splicing endonuclease 34 homolog	Sen-2	gi 61403497 gb AAH91756.1
cdmut	Zdhhc6	Zinc finger, DHHC domain containing 6		gi 23271076 gb AAH33317.1
Tab. 3.2: Mögliche Inter	raktionspartner der katal	ytischen Domäne von Titin aus dem Y2H		

Dargestellt sind die möglichen Interaktionspartner der katalytischen (cd) und der mutierten katalytischen Domäne (cdmut) von Titin aus dem Y2H-Screen, wobei jeweils das verwendete Köderprotein, der Gen- und Proteinname, sowie konservierte Domänen und die NCBI Nummer angegeben sind.

3.4.2 Interaktionsstudien in E. coli

Für die Interaktionsstudien in *E. coli* wurde die mutierte katalytische Domäne der Titinkinase (cdmut) in den pGex4T1-Vektor kloniert, um ein N-terminales Gst-Fusionsprotein zu generieren. Nach der Überexpression in E. coli und Aufreinigung über Sepharosebeads wurde das Gst-Fusionsprotein mit embryonalen Herzlysaten (E18) inkubiert, die möglichen Interaktionspartner anschließend eluiert und mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle wurde der leere Gst-Vektor verwendet. Die Überlagerung des Gst-Kontrollgels mit dem Gst-cdmut-Gel (Abb. 3.31 A) zeigt Proteine, die nur im Gst-Kontrollansatz vorhanden sind (grün), Proteine, die unspezifisch an die Kontrolle und die Gst-Fusionsproteine binden (gelb), sowie spezifische Interaktionspartner der Titinkinasedomäne (rot). Um sicherzustellen, dass die Interaktionspartner der Titinkinasedomäne aus dem Herzlysat stammen, wurde Gstcdmut überexprimiert, aufgereinigt und ohne Inkubation mit dem Herzlysat eluiert. Die Überlagerung der Gst-cdmut-Gele mit (rot) und ohne Herzlysat (grün) (Abb. 3.31 B) zeigt die spezifischen Bindungspartner der Titinkinasedomäne aus dem Herzlysat. Proteinspots die sowohl im ersten, als auch im zweiten Gel rot waren, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Da die Proteinkonzentration der Spots sehr gering war, konnte nur die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als möglicher Bindungspartner der Titinkinasedomäne identifiziert werden.



Abb. 3.31: Gst-Interaktionsstudien in E. coli

Das Fusionsprotein Gst-cdmut wurde in *E. coli* im pGex4T1-Vetor überexprimiert, über Sepharosebeads aufgereinigt und mit embryonalen Herzlysaten (E18) inkubiert. Anschließend wurden die gebundenden Interaktionspartner eluiert und im 2D-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde der leere pGex4T1-Vektor und Gstcdmut ohne Inkubation mit dem Herzlysat verwendet. Die Überlagerung des Gst-Kontrollgels mit dem Gstcdmut-Gel (A) zeigt Proteine, die nur im Gst-Kontrollansatz vorhanden sind (grün), Proteine, die unspezifisch an die Kontrolle und die Gst-Fusionsproteine binden (gelb), sowie spezifische Interaktionspartner der Titinkinasedomäne (rot). Die Überlagerung der Gst-cdmut-Gele mit (rot) und ohne Herzlysat (grün) ist in (B) dargestellt, wobei die spezifischen Bindungspartner der katalytischen Titinkinasedomäne rot sind. Proteine, die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als Bindungspartner der Titinkinasedomäne identifiziert werden (Pfeil).

3.4.3 Interaktionsstudien in C2C12-Zellen

Für die Bindungsstudien in Eukaryoten wurde die katalytische Domäne der Titinkinase bzw. die mutierte Form in C2C12-Zellen überexprimiert und über einen T7-Tag aufgereinigt. Anschließend wurden alle Proteine in der Elutionsfraktion verdaut und mittels HPLC-gekoppelter Massenspektrometrie identifiziert. Als Negativkontrolle diente ein Teil des Megalinproteins, das ebenfalls in C2C12-Zellen exprimiert und mit einem T7-Tag aufgreinigt wurde.

Die Ergebnisse der MS-Analyse sind in Tab. 3.3 dargestellt. Es wurden viele Proteine identifiziert, die unspezifisch sowohl an die Titinkinasedomäne, als auch an die Megalin-Kontrolle banden. Einige dieser Proteine wie Enolase1, Eef1a2, Hsp90 und Lectin wurden auch im Y2H-Screen (siehe 3.5.1) als mögliche Interaktionspartner der Titinkinasedomäne identifiziert. Durch die MS-Analyse konnten diese Proteine als spezifische Bindungspartner ausgeschlossen und so die Ergebnisse des Y2H-Screens schneller verifiziert werden.

Proteine, die nur in der Elutionsfraktion der Titinkinasedomäne gefunden wurden, waren z.B. die ribosomalen Proteine L18, L34, S18, S19, Nucleolin und Glutamyl-t-RNA-Synthetase, wobei man diese aufgrund ihrer Kernlokalisation als Bindungspartner der Titinkinase kritisch betrachten sollte. Mögliche zytoplasmatische Interaktionspartner sind die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die auch schon im Y2H-Screen und in den Bindungsstudien in *E. coli* gefunden wurde, Peroxiredoxin 1, Hsp70 kDa 5 (Grp78) und die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase. Überraschend war, dass mehr Proteine an die katalytische Titinkinasedomäne banden, als an die mutierte Form, obwohl diese in der aktiven Konformation vorliegen sollte.

unspezifische Bindungspartner Meg/cd/cdmut	spezifische Bindungspartner cd	spezifische Bindungspartner cdmut
14-3-3 zeta Aktin Aktin Aldolase 1, A Isoform 1 Aldolase 1, A Isoform Annexin A2 Desmin Enolase 1 Eukaryot. Translation Elongation Faktor 1 Filamin Hitzeschockprotein 86 kDa HSP90 beta Keratin Hitzeschockprotein 86 kDa HSP90 beta Keratin Dissiningen Aktivator Inhibitor 1 RNA-bindendes Protein Pyruvatkinase 3 S100 Calcium bindendes protein A4 Transgelin Tropomyosin Tropomyosin Tropomyosin	3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase 40S ribosomales Protein S18 40S ribosomales Protein S19 60S ribosomales Protein L34 Glutamyl-Prolyl-tRNA Synthetase Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogena Hitzeschockprotein 70kDa, 5, Glukose abh Nucleolin Peroxiredoxin 1 Ribosomales Protein L18	Phosphate Carrier Protein, Slc25member3 se ängig
Tab. 3.3: Unspezische und spezifische Bindungspartner der katalyti Um neue Bindungspartner der Titinkinase zu identifizieren wurde d anschließend mit möglichen Bindungspartnern über einen T7-Tag Masenspektrometer identifiziert. Als Kontrolle wurde ein Teil des Meg cdmut-Fraktion gefunden wurden (unspezifische Bindungspartner), sow	schen Titinkinasedomäne (cd) und der mutierter ie katalytische Domäne und eine mutierte Form aufgereinigt. Die Proteine wurden mit Trypsi alinproteins verwendet. Aufgelistet sind alle Protei ie Proteine, die nur an cd bzw. cdmut gebunden hat	Form (cdmut) (Y170->E170) in C2C12-Zellen überexprimiert und in verdaut und mittels HPLC-gekoppelten FTICR- ne, die sowohl in der Megalin-, als auch in der cd- und ben (spezifische Bindungspartner).