4 Diskussion

Titin ist das größte Protein in Säugetieren und bildet neben Aktin und Myosin das dritte Filamentsystem im Herz- und Skelettmuskel. Das Titinmolekül erstreckt sich von der Z-Scheibe über die I- und A-Bande bis zur M-Bande des Sarkomers. Die verschiedenen Domänen Titins übernehmen unterschiedliche Funktionen. Der C-Terminus enthält eine Serin-Threonin-Kinasedomäne, die in Vertebraten hochkonserviert ist. Obwohl der Titinkinase eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des Muskels zugeschrieben wird, ist bisher nur wenig über mögliche Substrate bekannt. Mit Hilfe eines Titinkinase-KO-Modells (Gotthardt et al., 2003) sollte die Funktion der Titinkinasedomäne und ihre Rolle in der Signaltransduktion des Herz- und Skelettmuskels näher untersucht werden. In diesem Modell wurde das M-Banden Exon 1, das für die Titinkinase codiert und das M-Banden Exon 2, zur Erhaltung des offenen Leserahmens, im Herz- und Skelettmuskel entfernt. Die Titinkinaseregion-defizienten Tiere entwickelten eine schwere Muskelschwäche ab der 3. Lebenswoche und starben mit einem Alter von 35 Tagen (Gotthardt et al., 2003). Zur Verifizierung des Herzphänotyps wurden im Rahmen dieser Arbeit ein zweites induzierbares KO-Modell verwendet, das die Deletion des M-Banden Exons 1 und 2 von Titin im ausgewachsenen Tier durch Injektion von Tamoxifen ermöglichte.

4.1. Titins M-Bande stabilisiert die Sarkomerstruktur im Herz- und Skelettmuskel

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der 30 Tage alten Titinkinaseregion- KO Tiere zeigten, dass die Deletion der Titinkinaseregion zur Auflösung der Sarkomerstruktur im Herzen führt (Gotthardt et al., 2003). Ob das auch auf die Skelettmuskulatur zutrifft und zu welchem Zeitpunkt die Disassemblierung des Sarkomers einsetzt war bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit angefertigte elektronenmikroskopische Aufnahmen vom Quadriceps von 5 und 10 Tage alten KO-Mäusen zeigten, dass bei den 5 Tage alten Mäusen noch keine Unterschiede zwischen KO und Kontrolle auftraten, während bei den 10 Tage alten Tieren bereits 30% der Sarkomere teilweise oder vollständig aufgelöst waren. Die Z-Scheibe war M-Bande häufig strukturiert. während die normal Immunfluoreszenzfärbungen von Titin und Titin-bindender Proteine bestätigten dies. Es zeigte sich, dass sowohl im Herzen, als auch im Quadriceps keine Färbung des C-terminalen

Teils der A-Bande und der M-Bande von Titin in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren auftrat, während die Z-Scheibe und die I-Bande eine normale gestreifte Färbung aufwiesen. Da die M-Bande hinter der Titinkinaseregion noch normal synthetisiert wird (Gotthardt et al., 2003), scheint der C-terminale Teil der A-Bande und die M-Bande von Titin nicht mehr in das Sakomer zu integrieren, während der N-terminale Teil des Titinmoleküls mit der Z-Scheibe und der I-Bande noch normal eingebaut wird. Die frühe Disassemblierung des Skelettmuskelsarkomers zwischen dem Tag 5 und 10 scheint ein direkter Effekt der Titinkinaseregion-Deletion zu sein, denn es passt zeitlich zum Expressionsmuster des MCKere Promotors, der kurz nach der Geburt am stärksten exprimiert wird (Lyons et al., 1991) und der *in vitro* Halbwertszeit von Titin ($t_{1/2}$ =3d) (Isaacs et al., 1989). Unklar ist, ob die Disassemblierung des Sarkomers aufgrund des fehlenden Einbaus der M-Bande in das Sarkomer oder durch die fehlende Signaltransduktion der M-Bande verursacht wird. Bisher wurde Titin eine Hauptrolle im Sarkomeraufbau zugesprochen, da es am Aufbau der Z-Scheibe, M-Bande und des dicken Filamentsystems beteiligt ist, sowie die Sarkomerlänge des dicken Filaments regulieren kann (Gregorio et al., 1999; Gautel et al., 1999; Maruyama, 1997; Tskhovrebova und Trinick, 2002). Da es sowohl mit Proteinen des dünnen, als auch des dicken Filaments interagiert, könnte es auch an der Fusion beider Filamentsysteme zum Sarkomer beteiligt sein (Gregorio et al., 1999; Holtzer et al., 1997). Weiterhin wurde postuliert, dass die Phosphorylierung von Tcap durch die Titinkinase in differenzierenden Myozyten eine wichtige Rolle in der Myofibrillogenese spielt (Mayans et al., 1998). Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass in den Herzen von Titinkinaseregion-defizienten Tieren das Sarkomer bis zum embryonalen Tag E9,5 normal aufgebaut wird und Tcap erst ab E15,5 exprimiert wird, wenn das Sarkomer bereits ausgebildet ist (Weinert et al., 2006). Dennoch ist die Entfernung der Titinkinaseregion in diesen Tieren embryonal letal, verursacht durch ein beeinträchtigtes Seitenwachstum und Disassemblierung des Sarkomers (Weinert et al., 2006). Daher scheint die M-Bande von Titin in der Aufrechterhaltung der Sarkomerstruktur und weniger im Sarkomeraufbau eine Rolle zu spielen. Das M-Banden bindende Protein Myomesin könnte dabei eine wichtige Rolle spielen, denn es hilft Titin die Ordnung der Myosinfilamente in der A-Bande während der Muskelkontraktion aufrecht zu erhalten (Agarkova und Perriard, 2005). In den Titinkinaseregion-KO-Tieren war die Proteinmenge von Myomesin zwar nicht verändert, es konnte aber in den Immunfluoreszenzfärbungen nicht mehr an der M-Bande detektiert werden. Außerdem konnte eine Mislokalisation der A-Bande in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren beobachtet werden, obwohl dieser Bereich von der Deletion nicht betroffen war. Page konnte zeigen, dass dies zu einer kontinuierlichen Kontraktion des Muskels führt (Page und Huxley, 1963). Die vermehrte Synthese von Detoxifizierungsenzymen in den Titinkinaseregion-KO weist ebenfalls auf eine erhöhte mechanische Belastung des Muskels hin.

Neben der Disassemblierung des Sarkomers in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren wurde auch eine Mislokalisation und vermehrte Synthese zytoskeletaler Proteine wie Desmin und α-Tubulin beobachtet. Desmin ist essentiell für die funktionelle Integrität der Myofibrillen, da es sie mit dem Sarkolemm, den Zellkernen, den Mitochondrien und den Mikrotubuli verbindet (Capetanaki et al., 1997). In zahlreichen Skelettmuskel- und Herzerkrankungen konnten Veränderungen in der Proteinmenge bzw. Lokalisation von Desmin und Tubulin nachgewiesen werden. So werden z.B. beide Proteine bei Hypertrophie vermehrt synthetisiert (Tagawa et al., 1998; Rappaport und Samuel, 1988). Es wird daher angenommen, dass die Akkumulation beider Proteine während Umstrukturierungsprozessen der Aufrechterhaltung der Zellstruktur dient (Wilding et al., 2005). Die Proteinmenge von Aktin, das neben Desmin und Tubulin ebenfalls zu den zytoskeletalen Proteinen zählt, war in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren nicht verändert. Es wurden aber viele Aktin-Bindeproteine, wie Adprhl1 und Cofilin 2, die an der Depolymerisation von Aktin beteiligt sind (Tsuyama et al., 1999; Ono et al., 1994), sowie Vinculin und Mitglieder der ERM-Familie (Radixin, Moesin und Villin), die Aktinfasern mit der Plasmamembran verknüpfen (Louvet-Vallee, 2000; Tokuyasu et al., 1981) akkumuliert. Die vermehrte Synthese zytoskeletaler Proteine, sowie zytoskeletaler Bindeproteine in den Titinkinaseregiondefizienten KO-Tieren dient wahrscheinlich der Aufrechterhaltung der Zellstruktur während der Hypertrophie- und Atrophieprozessen im Herz- bzw. Skelettmuskel. Außerdem wurden erhöhte Mengen des Muscle Lim Proteins (MLP) im Herz der Titinkinaseregion-KO-Tiere detektiert. MLP, das über Tcap an die Z-Scheibe von Titin bindet, ist am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt (Arber et al., 1997) und könnte daher ebenfalls die erhöhten Proteinmengen und die Mislokalisation zytoskeletaler Proteine in den Titinkinaseregion-KO-Tieren hervorrufen.

4.2 Die Sarkomerolyse im Titin M-Band KO führt zur Aktivierung einer generellen Stressantwort

Um einen Einblick in die molekularen Mechanismen der M-Banden Signaltransduktion zu bekommen wurde eine Proteomanalyse der Titinkinaseregion-defizienten Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die ersten Unterschiede zwischen WT und KO Tieren am Tag 10 im Herzen auftraten, während im Quadriceps erst am Tag 20 Unterschiede detektiert werden konnten. Da die Auflösung der Sarkomerstruktur im Quadriceps bereits am Tag 10 sichtbar war, ist die Akkumulation von Proteinen im Titinkinaseregion-KO wahrscheinlich ein sekundärer Effekt, verursacht durch die Disassemblierung des Sarkomers. Das Herz scheint außerdem die Deletion der M-Bande besser zu kompensieren als der Quadriceps, da viel weniger Proteine bei den 20 und 30 Tage alten KO-Herzen akkumulierten.

Der Großteil der vermehrt synthetisierten Proteine im Herz- und Skelettmuskel-KO waren Stress-assoziierte Proteine. Dazu zählen z.B. Hsp25/27, aB-Crystallin, cvHSP und Hsp20, die zur Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine gehören. Die kleinen Hitzeschockproteine werden durch eine Vielzahl von Stressoren, wie Hitzestress (Lindquist und Craig, 1988; van de Klundert et al., 1998), Serummangel (Djabali et al., 1997) und oxidativer Stress (Sakamoto et al., 1998; Golenhofen et al., 1999) induziert. Sie stabilisieren Proteine bei der Faltung oder Transport, spielen bei der Organisation des Zytoskeletts eine Rolle und sind in Differenzierung- und Transkriptionsprozessen involviert. (Perng et al., 1999; Liang und MacRae, 1997; Gusev et al., 2002; Welsh und Gaestel, 1998). Die vermehrte Synthese von kleinen Hitzeschockproteinen in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren könnte durch die Akkumulation und Mislokalisation von Desmin, Tubulin und Vimentin verursacht werden, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Destrukturierung des Zytoskeletts zur Aktivierung von Hsp25/27 und αB-Crystallin führt (Launay et al., 2006). Hsp25/27 trat in den Proteomanalyse der Titinkinaseregion-defizienten Tiere in drei verschiedenen Spots auf, was für eine posttranslationale Modifizierung des Proteins spricht. Sowohl αB-Crystallin, als auch Hsp25/27 werden unter verschiedenen Stressbedingungen (Hitze, Längenkontraktion des Muskels, Destrukturierung des Zytoskeletts) durch die p38 abhängige MAPKAP-Kinase 2 phosphoryliert (Stokoe et al., 1992; Koh und Escobedo, 2004; Rouse et al., 1994; White et al., 2006; Launay et al., 2006). Hsp25/27 kann zusätzlich auch durch Mk3, Mk5, PKCδ und PKD phosphoryliert (McLaughlin et al., 1996; New et al., 1998; Maizels et al., 1998b; Doppler et al., 2005) und oxidativ am Cys141 modifiziert werden (Eaton et al., 2002). Dabei scheinen die posttranslationalen Modifizierungen nicht immer ausschlaggebend für die Aktivität der kleinen Hitzeschockproteine zu sein. Möglich ist auch, dass beide Isoformen unterschiedliche Aufgaben übernehmen (Rogalla et al., 1999). Darauf deuten auch die Ergebnisse der 2D-Gele hin, denn sowohl die unmodifizierte, als auch die modifizierten Isoformen von Hsp25/27 wurden in den KO-Tieren vermehrt synthetisiert.

 αB -Crystallin interagiert neben den zytoskeletalen Proteinen Aktin, Desmin und Vimentin auch mit Titin. Golenhofen konnte zeigen, dass αB -Crystallin nach Ischemie und Überbelastung des Herzmuskels an die I-Bande von Titin bindet, um die für die Elastizität benötigten Ig-Domänen zu schützen (Golenhofen et al., 2002). Die später diskutierte Akkumulation von Antioxidantien in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren deutet ebenfalls auf eine Überbelastung des Muskels in den KO-Tieren hin.

Neben der Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine wurde in den Titinkinaseregion-KO-Tieren auch Hsp90 vermehrt synthetisiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hsp90 mit mehr als 200 zellulären Signalproteinen interagiert um sie vor Aggregation zu schützen und deren korrekte Faltung zu gewährleisten (Young et al., 2001a). Wie bei anderen Chaperonen wird die Transkription von Hsp90 unter anderem nach Hitze (Yonehara et al., 1996) und oxidativen Stress induziert (Nishizawa et al., 1996). Neben der Assoziation mit verschiedenen Co-Chaperonen, wie Hsp70 und p23, konnte auch eine Interaktion mit dem 20S-Proteasomenkomplex nachgewiesen werden (Conconi et al., 1999; Montel et al., 1999). Auch Hsp25/27 (Parcellier et al., 2003) und αB-Crystallin (Boelens et al., 2001) binden nach oxidativem Stress an das 20S-Proteasom, wobei gezeigt werden konnte, dass Hsp25/27 die Aktivität des Proteasoms erhöht (Parcellier et al., 2003). Die Induktion von Hitzeschockproteinen geht also häufig mit einer Induktion des Proteasomenkomplexes einher. Dies konnte auch in den Titinkinaseregion-KO-Tieren gezeigt werden. Neben der Akkumulation von Hitzeschockproteinen traten vermehrt verschiedene Untereinheiten des 26S-Proteasomenkomplexes in den KO-Tieren auf, was auf eine erhöhte Akkumulation von irreparabel geschädigten Proteinen hinweist. Da sowohl im Herzen, als auch im Skelettmuskel Titinkinaseregion-defizienten Tiere die gleichen Hitzeschockproteine Proteasomenbestandteile akumuliert wurden scheint dies Teil einer generellen Stressantwort zu sein, die wahrscheinlich durch das Auftreten denaturierter Proteine induziert wird.

4.3 Deletion der Titinkinaseregion führt zu oxidativem Stress

Sowohl im Herzen, als auch im Skelettmuskel der Titinkinaseregion-defizienten Tiere wurden vermehrt Detoxifizierungsenzyme synthetisiert, wobei sich der Zeitpunkt der Induktion und die Proteine in beiden Geweben stark unterschieden.

Im Quadriceps der Titinkinaseregion-KO-Tiere wurden vermehrt Peroxiredoxin 6, Myoglobin, Superoxiddismutase 1, Carbonicanhydrase 3 und Park7 akkumuliert. Myoglobin

ist ein wichtiger Regulator der Sauerstoffkonzentration in oxidativen Skelettmuskelfibrillen (im Quadriceps und Herz), da es Sauerstoff bindet und es konrolliert während hoher Muskelaktivität oder Hypoxie freigibt (Ordway und Garry, 2004). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass Myoglobin auch reaktiven Sauerstoff und Stickstoffmonoxid detoxifizieren kann (Flogel et al., 2004).

Park7 (DJ-1-Protein) wurde bisher nur in Zusammenhang mit Alzheimer und Parkinson im Gehirn erwähnt. Es konnte gezeigt werden, dass in erkrankten Patienten DJ-1 irreversibel oxidativ geschädigt ist (Bonifati et al., 2003; Choi et al., 2006). DJ-1 ist an der Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid beteiligt (Taira et al., 2004) und wird zusammen mit der Nucleosiddiphosphatkinase 1 (Nme1) als Plasmamarker für die Früherkennung von Schlaganfällen genutzt (Allard et al., 2005). Interessanterweise wurden auch Nme1 und 2 im der KO-Tiere vermehrt synthetisiert. Es wird angenommen, Nukleosiddiphosphatkinasen die Adenylylcyclase inhibieren und somit zu einer reduzierten cAMP-Signaltransduktion in insuffizienten Herzen führen (Lutz et al., 2001). Sowohl Nme1/2, als auch DJ-1 konnten auch im Herzen identifiziert werden, waren aber in den nichtinduzierbaren KO-Tieren unverändert. In den Tamoxifen-induzierbaren KO-Herzen hingegen war Nme1 und 2 ebenfalls hochreguliert. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass Nme1 im Herzen erst später hochreguliert wird als im Skelettmuskel. Da die nichtinduzierbaren Tiere aufgrund des Skelettmuskelphänotyps eher sterben konnte es wahrscheinlich erst in den induzierbaren Tieren detektiert werden.

Während Myoglobin, DJ-1 und die Superoxiddismutase spezifisch im Quadriceps der auftraten, Titinkinaseregion-defizienten Tiere vermehrt wurden im Herzen Glutathiontransferasen akkumuliert. Glutathiontransferasen sind zahlreichen Detoxifizierungsprozessen involviert (Jakoby, 1978). Die Glutathiontransferase omega interagiert außerdem mit dem sarkoplasmatischen Ryanodinrezeptor, dessen Funktion es im Herzen negativ reguliert, während es im Skelettmuskel diesen positiv beeinflusst. Die Inhibierung des RyR2 im Herzen schützt die Zellen vor Apoptose, verursacht durch erhöhte intrazellulare Ca²⁺ Konzentrationen (Dulhunty et al., 2001).

Die vermehrte Synthese von Detoxifizierungsenzymen im Herz- und Skelettmuskel der Titinkinaseregion-KO-Tiere deuten auf eine erhöhte Belastung des Muskels und oxidativer Stress hin. Diese Annahme wird weiter gestützt durch die vermehrte Synthese der Laktat Dehydrogenase, die unter Sauerstoffmangel Pyruvat zu Laktat reduziert (Gladden, 2004), sowie die Akkumulation pH regulierender Proteine wie Carbonic anhydrase 3 (Geers und

Gros, 2000; Wroblewski et al., 2005) und AMP Deaminase 1 (Korzeniewski, 2006) im Skelettmuskel der Titinkinaseregion-defizienten Tiere.

Versuche mit Muskelzellen zeigten, dass der Transkriptionsfaktor NFκB durch oxidativen Stress induziert wird und die Transkription von Detoxifizierungsenzymen, wie Katalasen, Superoxiddismutasen und Gluthationperoxidasen aktiviert (Zhou et al., 2001). Deshalb wurden die Titinkinaseregion-defizienten Tiere auf die Aktivierung von NFκB mittels EMSA überprüft, wobei keine Kernlokalisation von NFκB, die nach der Aktivierung der NFκB Untereinheiten auftritt, detektiert werden konnte. Die bisher veröffentlichten Daten zu NFκB in Bezug auf oxidativen Stress sind sehr umstritten, da sie sich häufig auf Zellkulturversuche beziehen, wobei Art und Konzentration der verwendeten Substanz zur Erzeugung des oxidativen Stresses nicht mit den *in vivo* Bedingungen übereinstimmen. Bowie und Kollegen schließen sogar eine physiologische Rolle von NFκB in oxidativen Stress-Signalwegen völlig aus (Bowie und O'Neill, 2000).

Mit Hilfe eines 2D-Gel-basierten Fluoreszenzassays (Hochgrafe et al., 2005) wurde untersucht, ob in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren Thiol-modifizierte Proteine auftreten. Bei vermehrter Produktion von Sauerstoffradikalen oder verminderter Aktivität der Radikal-vernichtenden Enzyme kann es zu einer Schädigung von Proteinen durch die Oxidation der Thiolgruppe von Cysteinen kommen. Überraschenderweise konnten bereits in den Kontrollgelen der Wildtypen Cystein-modifizierte Spots detektiert werden. Dabei handelte es sich um Proteine, die bereits unter normalen Bedingungen Disulfidbrücken zur Strukturerhaltung oder aufgrund eines katalytischen Reaktionsmechanismus ausbilden. Dazu gehörte z.B. Albumin, das 5-6 intramolekulare Disulfidbrücken ausbildet, sowie die Peroxiredoxine 2 und 6, deren katalytisches Cystein zur Sulfensäure während der Interaktion mit den Substraten oxidiert wird (Marchler-Bauer et al., 2005). Obwohl im Skelettmuskel der Titinkinaseregion-KO-Tiere mehr Antioxidantien auftraten als im Herzen, konnten keine oxidierten Thiolgruppen detektiert werden, während im Herz der KO-Tiere ein Protein eine Cysteinmodifizierung aufwies. Das Protein hat ein Molekulargewicht von ~17500 Da und isoelektrischen Punkt von ~5,3. Leider konnte es bisher durch massenspektrometrische Analyse nicht identifiziert werden, da die Proteinmenge zu gering war. Interessant ist, dass es nur im Herzen und nicht im Skelettmuskel auftrat, was darauf schließen lässt, dass es entweder spezifisch im Herzen exprimiert wird oder das unterschiedliche Signalwege im Herzen und im Skelettmuskel nach Deletion der Titinkinaseregion eine Rolle spielen. Da keine weiteren oxidativ geschädigten Proteine

auftraten, scheint die Cysteinmodifizierung dieses Proteins spezifisch zu sein und nicht die Folge einer generellen Schädigung durch oxidativen Stress.

Inwieweit Titins M-Bande an der Modifizierung des Proteins beteiligt ist, muss weiter geklärt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die IgI1-Domäne in der I-Bande von Titin eine reversible Disulfidbrücke ausbilden kann, die die elastischen Eigenschaften von Titin im Sarkomer beeinflusst. Bei mindestens 40 weiteren Ig-Domänen von Titin wäre diese Disulfidbrückenbildung möglich (Mayans et al., 2001). Titin wäre daher ein geeigneter Redoxsensor des Muskels.

4.4 Unterschiede in der Adaptation des Stoffwechsels in Titinkinaseregion-KO Herzen und Skelettmuskel

Unterschiede im Skelettmuskel- und Herzproteom der Titinkinaseregion-defizienten Tiere konnten besonders beim Metabolismus beobachtet werden. Während im Skelettmuskel der Lipid- (Hydoxyacyl-CoA-Dehydrogenase beta, Fatty acid binding protein 3) und Glycogenstoffwechsel (Phosphoglucomutase 2), sowie die Laktatproduktion (Laktatdehydrogenase 2) hochreguliert wurden, traten im Herzen der Titinkinaseregiondefizienten Tiere vermehrt Enzyme der Glycolyse (Phosphofructokinase, Hexokinase 2) und des Tricarbonsäurezyklus (Dihydrolipoamid-S-Succhinyltransferase) auf, was auf eine erhöhte mechanische Belastung in beiden Geweben und auf Energiemangel im Skelettmuskel hinweist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Skelettmuskel 75 % seiner Energie auch aus dem Glycogen- und Fettsäurestoffwechsel beziehen kann, während das Herz aufgrund der ständigen Kontraktionen vorwiegend Glucose verstoffwechselt (Berger et al., 1976) was die Unterschiede im Metabolismus von Herz und Quadriceps in den Titinkinaseregion-KO-Tieren erklären könnte. Diese könnten letztendlich auch zur beobachteten Atrophie im Muskel und Hypertrophie im Herzen der Titinkinaseregion-KO-Tiere führen.

4.5 Deletionen in der I- und M-Bande von Titin führen zu ähnlichem Skelettmuskel-Phänotyp

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 ohne Beeinträchtigung des Herzens und sterben im Alter von zwei Monaten (Garvey et al., 2002). Calpain 3 ist an der Myofibrillogenese und dem Sarkomeraufbau beteiligt (Kramerova et al., 2004) und induziert die Proteolyse verschiedener Muskelproteine, wie Titin, Talin, Ezrin, Filamin C and Vinexin (Taveau et al., 2003). Die Muskelschwäche in den Mdm-Mäusen wird aber nicht alleine durch Calpain 3 verursacht, da in Calpain 3 KO-Mäusen oder bei Überexpression von Calpain 3 keine myonucleare Apoptose auftritt (Huebsch et al., 2005). Die MARPs Proteinfamilie, zu denen CARP, DARP und Ankrd2/Arpp gehören, kann unter erhöhter Myofibrillendehnung ebenfalls an die N2A-Region von Titin, N-terminal von Calpain 3 binden (Bang et al., 2001b). Witt konnte zeigen, dass die mRNA von CARP und Ankrd2 in den Mdm-KO Mäusen hochreguliert war, obwohl die Bindungstelle für die MARPs nicht deletiert wurde, was auf eine Interaktion von Calpain 3 und CARP/Ankrd2 hinweist (Witt et al., 2004). CARP reguliert die Nkx2.5-abhängige Genexpression im Herzen und im Skelettmuskel während der Entwicklung (Jeyaseelan et al., 1997; Baumeister et al., 1997). Die Deletion der Calpain 3 Bindungsstelle könnte daher zur erhöhten Expression von CARP und dann zu einer Inhibierung von Nkx2.5 führen (Witt et al., 2004). Calpain 3 bindet zusätzlich zur N2A-Region auch an die M-Bande (Sorimachi et al., 1995; Kinbara et al., 1997) und Z-Scheibe von Titin (Sorimachi et al., 1995). An der M-Bande überlappen jeweils die C-Termini zweier entgegengesetzt verlaufender Titinmoleküle, so dass eine Interaktion von Calpain 3, mit Murf1 von einem entgegengesetzt verlaufenden Titinmolekül, ermöglicht wird (Gregorio et al., 1999). Bisher ist die Funktion dieser Assoziation unklar, Murfl könnte möglicherweise ein Substrat von Calpain 3 sein (Ojima et al., 2006). Interessant ist auch, dass beide Proteine bei Ubiquitinylierungs- und Degradationsprozessen eine Rolle spielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Spaltung von Muskelproteinen durch Calpain 3 zur Ubiquitynilierung und Abbau dieser Proteine durch das 26S-Proteasom führt (Hasselgren und Fischer, 2001) und das Murf1, eine Ubiquitin Ligase mit Ubiquitin related modifier 3 SUMO-3 (Dai und Liew, 2001) interagiert. Die Deletion der Titinkinaseregion beinhaltet auch die Entfernung der Murfl Bindungsstelle. Außerdem zeigten die Immunfluoreszenzanalysen, dass der Bereich der M-Bande hinter der Titinkinaseregion, der auch die Calpain 3 Bindungsstelle enthält, in den KO-Tieren nicht mehr ins Sarkomer integriert wird. Daher könnnte Calpain 3 den Phänotyp in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren im Quadriceps beeinflussen, obwohl die Proteinmenge von Calpain 3 in den Titinkinaseregion-defizienten

Tieren nicht verändert war. Eine Proteomanalyse der 32 Tage alten Mdm-Tieren zeigte, dass die Mehrzahl der akkumulierten Proteine auch bei den 30 Tage alten Titinkinaseregiondefizienten Tieren auftrat. Darunter die Gruppe der kleinen Hizeschockproteine mit cvHspb, Hsp20 und αB-Crystallin, die oxidativen Stress-assoziierten Proteine, Peroxiredoxin 6, Superoxiddismutase 1, Laktatdehydrogenase 2, Carbonicanhydrase 3 und Myoglobin, Proteasomenbestandteile, sowie die zytoskeletalen Proteine Desmin und Tubulin. Die Z-Scheibe, I- und A-Bande, sowie die M-Bande von Titin zeigten in Immunfluoreszenzfärbungen der 32 Tage alten Mdm-Tieren eine normale Struktur, daher kann ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen im Proteommuster im Quadriceps der Titinkinaseregion- und der Mdm-KO-Tiere alleine durch die Muskelschwäche in beiden Stämmen verursacht wurden. Trotz intakter Z-Scheibe und M-Bande wurden neben CARP1 (I-Bande) auch Proteine der M-Bande (Murf1) und Z-Scheibe (MLP) im Mdm-KO hochreguliert (Witt et al., 2004), während in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren Bindungsproteine der I-Bande, wie CARP1 und Ankrd2 (Gotthardt et al., 2003) und Z-Scheiben bindende Proteine, wie Tcap, MLP und Calsarcin 2 und 1 akkumulierten, obwohl diese von der Deletion nicht betroffen waren. Sowohl für Tcap und MLP als auch für CARP1 und Ankrd2 wird eine Rolle in der Weiterleitung des Dehnungssignals im Muskel angenommen (Knoll et al., 2002; Bang et al., 2001a). Granzier postulierte, dass es an der Z-Scheibe, A-Bande und M-Bande von Titin "Hotspots" der Signaltransduktion gibt, die untereinander durch Proteine, wie Calpain 3 und Tcap, die an mehrere Hotspots binden, kommunizieren (Granzier und Labeit, 2004). Dadurch können sowohl Dehnungsreize des Aktin-Myosin-Systems (durch die M-Bande und Z-Scheibe) und der Membran (durch die Z-Scheibe), als auch passive Dehnung (durch die I-Bande) durch Titin verarbeitet und weitergeleitet werden. Die Integrität des gesamten Titinmoleküls scheint daher unerlässlich für seine Funktion zu sein und könnte die Akkumulation Z-Scheiben und I-Banden bindender Proteine in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren erklären.

Es wäre weiterhin interessant, ob eine Proteomanalyse eines Z-Scheiben-KO von Titin zu ähnlichen Unterschieden im Proteinmuster führt wie bei den Titin M-Banden-(Titinkinaseregion) und I-Banden- (Mdm) KO-Tieren. Aufgrund der kürzeren Lebensdauer der Titinkinaseregion-KO-Tiere scheint es aber zusätzliche Signalwege in der M-Bande zu geben, die den Phänotyp beeinflussen. Die Titinkinaseregion-KO-Tiere zeigen außerdem einen Herzphänotyp, der bei den Mdm-KO-Tieren nicht auftritt.

4.6 Deletion der Titinkinaseregion führt zur Hypertrophie im Herzen und Atrophie im Skelettmuskel

Die Deletion der Titinkinaseregion in der gestreiften Muskulatur führte zu einer Hypertrophie des Herzens, während der Quadriceps an Muskelmasse verlor und apoptotisch wurde. Im induzierbaren herzspezifischen Titinkinaseregion-KO konnte außerdem, aufgrund der längeren Lebensdauer, eine Vergrößerung der Lungen beobachtet werden, was auf eine schwere Herzinsuffizienz in diesen Tieren schließen lässt. Die erhöhten RNA-Mengen von ANP und BNP in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren 30 Tage nach 2 Injektionsrunden bestätigen das. Beide Proteine werden aufgrund ihrer antihypertrophen, vasodilatativen und diuretischen Eigenschaften bei akuten und chronischen Stress des Herzens vermehrt synthetisiert und daher als Herzinsuffizienz- und Hypertrophiemarker bzw. therapeutisch eingesetzt (Bonow, 1996; Grantham und Burnett, Jr., 1997; Cheung und Kumana, 1998; Sagnella, 1998; Clerico et al., 2000; Yoshimura et al., 2001).

Eine Literaturrecherche der Proteomdaten ergab weiterhin, dass viele der vermehrt synthetisierten Proteine in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren von PKCE und PKCS reguliert werden, wie Peroxiredoxin 6, Enolase 1, Hsp20, Hsp25/27, Vinculin, αB-Crystallin und Desmin (Mayr et al., 2004b; Edmondson et al., 2002; Ping et al., 2001). Sowohl PKCE als auch PKCδ spielen eine wichtige Rolle bei Hypertrophie- und Apoptose-Prozessen verursacht durch Ischemie oder erhöhter Belastung des Herzmuskels (Heidkamp et al., 2001; Clerk et al., 1994; Inagaki et al., 2003a; Inagaki et al., 2003b; Bogoyevitch et al., 1993; Liu et al., 2001; Hahn et al., 2002b; Pan et al., 2005; Takeishi et al., 2000; Mochly-Rosen et al., 2000). Beide werden durch Stimulierung des Gaq gekoppelten Rezeptors, z.B. durch Endothelin 1 oder Phenylephrin im Herzen aktiviert (Kilts et al., 2005) und können ihre Expressionslevel gegenseitig beeinflussen. Aufgrund der überlappenden Funktionen, der gleichen Aktivierung und das Fehlen eines Phänotyps, wenn nur eins der beiden Proteine ausgeknockt wird, ist es wahrscheinlich, dass PKCδ und PKCε die Funktionen des jeweils anderen teilweise übernehmen können (Klein et al., 2005). Allerdings führt oxidativer Stress zur Bildung einer Disulfidbrücke im regulatorischen Zentrum von PKCδ und PKCε, wodurch PKCε inaktiviert und PKC8 aktiviert wird (Chu et al., 2004). Unterschiede gibt es außerdem in der Substratspezifität beider Proteinkinasen. So aktiviert PKCE unter erhöhter Belastung des Herzen p42/44 MAPK, während PKC8 unter den gleichen Bedingungen p38 MAPK, sowie Kollagen I und III aktiviert (Klein et al., 2005). Durch Protein- und Expressionsanalysen konnte die erhöhte Synthese von PKCδ in den Tamoxifen-induzierbaren-Tieren im Herzen

bestätigt werden. Die induzierbaren Titinkinaseregion-defizienten Tiere zeigten außerdem eine veränderte Lokalisation von PKCS. Die Proteinmenge und Lokalisation von PKCs hingegen war unverändert, während die m-RNA leicht runterreguliert war. Die vermehrte Synthese von PKCδ in den Herzen der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tiere könnte durch oxidativen Stress oder erhöhte Belastung des Herzmuskels verursacht worden sein, da PKCδ unter diesen Bedingungen induziert wird (Klein et al., 2005; Majumder et al., 2001). Die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges über PKCδ führt zur Phosphorylierung der kleinen Hitzeschockproteinen Hsp20, Hsp25/27, sowie CCT-1ζ (Mayr et al., 2004; Klein et al., 2005), wobei Hsp25/27 auch direkt von PKCδ phosphoryliert werden kann (Maizels et al., 1998). Die posttranslationale Modifizierung der kleinen Hitzeschockproteine scheint wichtig Integrität des Sarkomers zu sein, da Überexpression eines Translokationsinhibitors in Mäusen zur Auflösung des Zytoskeletts, erhöhte Synthese von αB-Crystallin und schließlich Kardiomyophatie führte (Hahn et al., 2002). Daher könnten die erhöhten Mengen an Hitzeschockproteinen und die posttranslationale Modifikation von Hsp25/27, sowie die Mislokalisation zytoskeletaler Proteine in den Titinkinaseregiondefizienten Tieren auch durch PKC8 verursacht werden.

Interessant ist, dass der Rezeptor der PKC-Isoformen RACK1 in den Titinkinaseregion-defizienten Tiere im Quadriceps ebenfalls vermehrt synthetisiert wurde. Die Interaktion von RACK mit den PKC-Isoformen dient der Translokation der Proteinkinasen und erhöht deren Aktivität (McCahill et al., 2002). Leider wurde die Interaktion von PKCδ mit RACK1 bisher wenig untersucht. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Translokation von PKCε an die Focalen Adhäsionen und damit Aktivierung von Hypertrophiesignalwegen durch die Bindung von Murf1 an RACK1 verhindert wird (Arya et al., 2004). Murf1, dessen Bindungsstelle in den Titinkinaseregion-KO-Tieren deletiert ist, wurde in den Tamoxifen-induzierbaren Tieren leicht hochreguliert, zeigte aber in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren in der gestreiften Muskulatur keine Unterschiede in der Proteinmenge. Murf1 ist als Ubiquitinligase in Degradationsprozesse des Proteasoms involviert und wird in zahlreichen Atrophiemodellen hochreguliert (Bodine et al., 2001). Inwieweit Murf1 die Aktivität und Lokalisation von PKCδ, sowie die Akkumulation von RACK1 in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren beeinflussen kann, muss näher untersucht werden.

4.7 Titin beeinflusst die systolische Funktion des Herzens

Die kardiale Hypertrophie, sowie die Akkumulation von Detoxifizierungsenzymen in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren weisen auf eine länger anhaltende Überbelastung des Herzens hin. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Henk Granzier (Washington State University, Pullman, USA) wurden Versuche an isolierten Herzen von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Titinkinaseregion-KO-Tiere durchgeführt, um die möglichen Ursachen der Hypertrophie zu identifizieren.

Dabei zeigte sich, dass die Kontraktilität der Tamoxifen induzierten KO-Herzen nach Dobutaminbehandlung bereits 30 Tage nach einer Injektionsrunde (30d/1) verringert war, während die Hemmung der adrenergen Signaltransduktion durch den Betarezeptorblocker Propanolol nicht beeinträchtigt war. Die Behandlung von Lösungsmittel- und Tamoxifen induzierten Kontrollherzen mit hohen Calciumkonzentrationen führte bei den Lösungsmittelinjizierten Herzen zu einer Verstärkung der Kontraktilität, die bei den Tamoxifen behandelten Mäusen 30 Tage nach 2 Injektionsrunden (30d/2) nicht mehr auftrat, was auf Veränderungen auf Ebene der Calciumhomöostase hindeutete.

Um auszuschließen, dass die verminderte adrenerge Signaltransduktion in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren zum Zeitpunkt (30d/2) durch Strukturveränderungen des Sarkomers verursacht wird, wurde die Kraftentwicklung einzeln isolierter Muskelfasern in Aghängigkeit von Ca²⁺ bestimmt. Dabei zeigte sich, dass trotz fehlerhaftem Einbau des verkürzten Titins in das Sarkomer, die relative Spannung der Muskelfasern in den Mcm-KO zum Zeitpunkt (30d/2) noch normal war. Weiterhin wurde die Proteinmenge von Troponin I mittels Western Blot überprüft. Troponin I gehört zum Troponinkomplex (Troponin I, T, C) und vermittelt nach Ca²⁺-Einstrom in das Zytoplasma die Kontraktion des Muskels. Western Blot Analysen zeigten, das die Proteinmenge des Gesamttroponins unverändert war, während phosphoryliertes Troponin I (TntI) im KO vermindert auftrat. Troponin I kann durch PKA und PKC phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung durch PKA nach adrenerger Stimulation beschleunigt die Relaxation des Muskels, während die PKC abhängige Phosphorylierung die Relaxation verlangsamt und dadurch den Energieverbrauch des Muskels reduziert (Pi et al., 2002; Pi et al., 2003). Die Dephosphorylierung von Troponin I durch die Protein Phosphatasen PP1 und PP2a ist weniger gut untersucht (Deshmukh et al., 2006; Jideama et al., 2006). Es wird angenommen, dass die Stimulierung von Adenosin- und Muscarinrezeptoren zur Aktivierung von p38 MAPK und der Protein Phosphatase 2A (PP2A) führen (Liu und Hofmann, 2002). Obwohl die Dephosphorylierung von Troponin I die Aktivität und Ca²⁺ Sensitivität der Ca²⁺ abhängigen Mg²⁺-ATPase beeinträchtigt, ist der Effekt nicht reziprok zur Phosphorylierung von Troponin I (Jideama et al., 2006). Die reduzierte adrenerge Signaltransduktion in den Mcm-KO-Tieren kann also nicht durch Veränderungen auf Sarkomerebene erklärt werden, sondern ist wahrscheinlich die Folge einer gestörten Ca²⁺ Homöostase, die wiederum auch die Aktivität der PKA und PKC beeinflußt und somit auch die Phosphorylierung von Troponin I.

Wichtige Regulatoren des Ca²⁺-Stoffwechsels im Herzen sind die L-type Calcium-Kanäle (LTCC), durch die Ca²⁺ in die Zelle gelangt, Ryanodinrezeptoren, die den Ca²⁺ Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) bewirken, die Ca²⁺-ATPase Serca2, die Ca²⁺ während der Relaxation in das SR zurücktransportiert, sowie ihr Regulator Phospholamban. Unter normalen Bedingungen ist Serca2 an PLB gebunden. Bei adrenerger Stimulation aber wird Phospholamban durch PKA phosphoryliert und verliert dadurch seine Bindungsaffinität zu Serca, wodurch Serca mehr Ca²⁺ binden und aus dem Zytoplasma in das SR transportieren kann (Verboomen et al., 1992; Tada und Toyofuku, 1996). Protein- und Expressionsanalysen zeigten, dass die m-RNA und Proteinmenge von LTCC in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren nicht verändert war, während die Ca²⁺-ATPase Serca2a und Phospholamban in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren auf m-RNA und Proteinebene runterreguliert wurde. Wie die Titinkinase oder M-Banden bindende Proteine direkt den Ca²⁺-Stoffwechsel und damit die systolische Funktion des Herzens beeinflussen könnten ist spekulativ. Bisher wurde Titin nur in Zusammenhang mit der diastolischen Herzfunktion erwähnt, da die Expression verschiedener Isoformen von Titin (N2A oder N2AB) die Steifheit des Herzens und dadurch die diastolischen Eigenschaften verändern kann (Granzier und Labeit, 2004).

Antoons konnte zeigen, dass in MLP-KO-Tieren vermehrt PLB phosphoryliert wird (Antoons et al., 2006). In den induzierbaren Titinkinaseregion-defizienten Tieren ist die m-RNA von MLP im Herzen zweifach hochreguliert. Das könnte zu einer vermehrten Dephosphorylierung von PLB führen, so dass Serca gehemmt wird. MLP bindet zusammen mit Tcap, ein postuliertes Substrat der Titinkinase, an die Z-Scheibe von Titin (Knoll et al., 2002; Gregorio et al., 1998; Mayans et al., 1998). Tcap wurde im Quadriceps, aber nicht im Herzen der Titinkinaseregion-KO-Tiere vermehrt synthetisiert, was auf eine unterschiedliche Funktion im Herz- und Skelettmuskel hindeutet. Sowohl Tcap, als auch MLP interagieren mit Mitgliedern der Calsarcin Familie (Frey et al., 2000; Heineke et al., 2005; Frey und Olson, 2002), die ebenfalls in den Titinkinaseregion-KO-Tieren im Quadriceps (Calsarcin 1) und im Herzen (Calsarcin 2) vermehrt synthetisiert wurden. Beide Isoformen interagieren mit der Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Phosphatase Calcineurin (Frey et al., 2000; Frey et al., 2004).

Überexpression von Calcineurin im Herzen führt zur Hypertrophie und Kardiomyopathie mit vermehrter Expression von ANP und BNP, während Serca2 reprimiert wird (Franco et al., 1998; Molkentin et al., 1998). Im Skelettmuskel hingegen bewirkt die Überexpression von Calcineurin eine Umwandlung von Fast Twitch Muskelfasern zu Slow Twitch Muskelfasern mit vermehrter Expression von Myoglobin (Chin et al., 1998b; Delling et al., 2000). Obwohl Calsarcin-1 die Aktivierung von Calcineurin negativ reguliert (Frey et al., 2004) weist die Akkumulation von Myoglobin im Quadriceps der Titinkinaseregion-defizienten Tiere, sowie die Hochregulation von ANP und BNP und die Reprimierung von Serca2 im Herzen der Tamoxifen-induzierbaren KO-Tiere auf eine erhöhte Calcineurin-Aktivität in beiden Geweben hin. Die Akkumulation von MLP in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren könnte könnte demnach die Serca Expression sowohl über den Calcineurin Signalweg, als auch über die Phosphorylierung von Phospholamban beeinflussen. Leider wurde die Proteinmengen von Calcineurin und phosphoryliertem Phospholamban den Titinkinaseregion-KO-Tieren nicht überprüft.

Weitere Proteine, die die Expression von Serca in den Titinkinaseregion-KO-Tieren beeinflussen könnten, sind PKCδ und BNP. BNP wirkt der Erhöhung der Serca-Expression durch Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase entgegen (Kogler et al., 2006), während PKCδ den MEK-p38 Signalweg aktiviert (Porter et al., 2003). Beide könnten die Serca2 Expression in den induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Tieren 30 Tage nach zwei Injektionsrunden beeinflussen, da sie zu diesem Zeitpunkt hochreguliert werden. Da Serca2 aber bereits 5 Tage nach einer Injektionswoche mit Tamoxifen vermindert synthetisiert wurde, scheinen zusätzlich andere Signalwege involviert zu sein.

Interessant ist, dass sowohl Serca2, als auch PLB und Calmodulin1, das ebenfalls vermindert in den Tamoxifen induzierbaren Tieren auftrat, bei oxidativen Stress modifiziert werden. Die Inaktivierung der Proteine verhindert die weitere Produktion von reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS) und hemmt die ATP-Synthese (Kang et al., 2006; Singh et al., 2004; Squier, 2001). Da bereits gezeigt wurde, dass in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren oxidativer Stress auftritt, könnte dies ebenfalls die Proteinmenge von Serca, PLB und Calmodulin 1 beeinflussen.

Im Gegensatz zum reduzierten Proteinlevel war die Aktivität von Serca2 in den Tamoxifeninduzierten Tieren gegenüber den Lösungsmittel-behandelten Tieren erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Serca2^{b/b} und SKO-Maus beschrieben (Antoons et al., 2003a; Vangheluwe et al., 2006). In diesen Tiermodellen wird anstatt der Serca2a- die Serca2b-Isoform im Herzen exprimiert, die eine höhere Affinität zu Calcium besitzt. Die Expression der Serca2b-Isoform führt zu einer Verringerung der Gesamtproteinmenge von Serca. Es wird angenommen, dass dies die höhere Affinität der ATPase zu Ca²⁺ kompensieren soll, da eine hohe Serca-Aktivität zu einer geringeren Lebensspanne und Hypertrophie führt und damit der Zelle mehr schaden könnte. (Antoons et al., 2003; Vangheluwe et al., 2006). Es müßte geklärt werden, ob in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren ähnliche kompensatorische Effekte eine Rolle spielen. Die Proteinmengen von Serca und PLB wurden bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt runterreguliert (ab 5d/1), während die Aktivitätsmessungen erst zu einem späteren Zeitpunkt (30d/2) durchgeführt wurden. Daher wäre es wichtig zu klären, ob die Aktivität von Serca erst nach der Verringerung der Proteinmenge erhöht wird oder die Ursache dafür ist.

4.8 Mögliche Substrate der Titinkinase

Obwohl angenommen wird, dass die Titinkinasedomäne eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des Muskels einnimmt, sind bisher sind nur wenige Substrate bekannt. Mayans konnte zeigen, dass Tcap während der frühen Differenzierung von C2C12 Zellen von der Titinkinase phosphoryliert wird und postulierte eine mögliche Funktion von Tcap in der Myofibrillogenese. Neuere Untersuchungen zeigen hingegen, dass Tcap erst nach der Myofibrillogenese ab E15,5 exprimiert wird (Weinert et al., 2006). Dennoch war die Proteinmenge von Tcap im Quadriceps, aber nicht im Herzen der Titinkinaseregiondefizienten Tiere erhöht, was auf eine unterschiedliche Signaltransduktion der Titinkinaseregion im Herz- und Skelettmuskel hinweist.

Ein weiteres postuliertes Substrat der Titinkinase ist Nbr1, das mit p62 interagiert. Während normaler Muskeltätigkeit bindet p62 an Murf2 und lokalisiert es dadurch an die M-Bande von Titin. Bei mechanischem Stillstand hingegen wandert Murf2 in den Kern und hemmt die Expression des Serum Response Factors (SRF) (Lange et al., 2005). In den Titinkinaseregion-KO-Tieren konnte dies aber nicht bestätigt werden, da die RNA- und Proteinmenge von SRF unverändert war.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines Y2H-Screens und Massenspektrometriegekoppelten Pulldownanalysen 40 neue Bindungspartner der Titinkinase identifiziert. Ein möglicher Interaktionspartner ist die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die in Interaktionsstudien in *E. coli* und in C2C12 Zellen identifiziert werden konnte. Sowohl für Titins I-Bande (über FHL2/DRAL), als auch für Titins M-Bande (über Murf1) konnte bereits die Bindung zahlreicher metabolischer Enzyme, wie die Phosphofructokinase, Creatinkinase

und Pyruvatkinase, (Witt et al., 2005; Lange et al., 2002) nachgewiesen werden. Die Kompartimentierung glycolytischer Enzyme an das Sarkomer deckt so den hohen Energiebedarfs des Muskels. Eine regulatorische Funktion der Titinkinase in Bezug auf GAPDH kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Weitere möglicher Bindungspartner der Titinkinase, die im Y2H-Screen identifiziert werden konnten, sind RACK1 (Gnb2l1) und Ankrd12. RACK1 ist der Rezeptor der PKC und wurde bereits als Interaktionspartner von Murf1 beschrieben (Arya et al., 2004), das neben der Titinkinase bindet. In den Titinkinaseregion-defizienten Tieren war die Proteinmenge von RACK1 im Quadriceps und von PKCδ und Murf1 in den Tamoxifen-behandelten Herzen erhöht. Inwieweit RACK1 in der Signaltransduktion der Titinkinase involviert sind, muss durch weitere Versuche geklärt werden.

Ankrd12 ist ein Homolog von Ankrd2, das vermehrt bei der Dehnung von Myofibrillen auftritt (Kemp et al., 2000) und zusammen mit CARP und Calpain 3 an die I-Bande von Titin bindet (Bang et al., 2001b). Ein weiteres Homolog von Ankrd12 ist Ankrd1,5. Ankrd1,5 ist ein sarkoplasmatisches Transmembranprotein, das mit Obscurin interagiert und so das SR an die Z-Scheibe von Titin koppelt (Bagnato et al., 2003). In den Titinkinaseregion-defizienten Tieren waren wichtige Ca²⁺-regulatorische Proteine des SR, wie Serca und Phospholamban runterreguliert. Außerdem konnte eine veränderte Ca²⁺-Homöostase und die vermehrte Synthese von dehnungssensitiven Proteinen, wie MLP und Ankrd2 beobachtet werden. Ankrd12 wäre daher, aufgrund der Funktion seiner Homologe Ankrd2 und Ankrd1.5, die an die Z-Scheibe und I-Bande von Titin binden, ein idealer Bindungspartner der Titinkinase um den Phänotyp in den Titinkinaseregion–KO-Tieren zu erklären.

4.9 Aussicht

Bei den verwendeten Titinkinaseregion-KO-Modellen beinhaltet die Deletion der Titinkinase auch die Entfernung zahlreicher Bindungsstellen für M-Banden Proteine. Obwohl die M-Banden Proteine in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren keine Unterschiede in der Protein- und Genexpression zeigten, könnten diese durch Mislokalisation oder posttranslationaler Modifizierung den Phänotyp beeinflussen. Um isoliert die Funktion der Titinkinase zu untersuchen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein KO der katalytischen Titinkinasedomäne generiert. Mit diesem Modell können die direkten Effekte der Titinkinase von denen der M-Banden bindenden Proteine unterschieden werden.

Weiterhin bleibt zu untersuchen, wie die M-Bande von Titin die systolischen Eigenschaften des Herzens beeinflusst. Wir konnten bisher zeigen, dass Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums, sowie Calmodulin 1 in den Titinkinaseregion-defizienten Tieren runterreguliert wurden. Durch Interaktionsstudien, wie Yeast Two Hybrid Screen und MS-gekoppelte Immunpräzipitationen konnten neue Titinkinase-Interaktionspartner, wie Ankrd12 identifiziert werden, die durch funktionelle Analysen verifiziert werden müssen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Deletionen in der I- und M-Bande von Titin zu ähnlichen Veränderungen des Proteoms führen. Außerdem wurden in beiden KO-Modellen Proteine der Z-Scheibe, wie z.B. MLP hochreguliert obwohl die Struktur der Z-Scheibe intakt war. Dies könnte auf eine intramolekulare Signaltransduktion zwischen der Z-Scheiben, I- und M-Banden Domäne von Titin hinweisen, möglicherweise über gemeinsame Bindungspartner wie FHL2, Tcap und Calpain. Es wäre daher interessant zu klären, ob ein Knockout in der Z-Scheiben Region von Titin die gleichen Unterschiede im Proteommuster zeigt und Proteine der I- und M-Bande von Titin, wie CARP, Ankrd2 und Murf1 akkumulieren.

Der in dieser Arbeit verwendete Titinkinaseregion-KO in der gestreiften Musukulatur führte zur Ausbildung einer Muskelschwäche und Tod während der juvenilen Entwicklung. Es wäre daher sinnvoll einen induzierbaren Skelettmuskel-KO zu generieren, um den Phänotyp in der adulten Maus untersuchen zu können, wenn das Sarkomerwachstum bereits abgeschlossen ist. Aufgrund der Bindung von dehnungssensitiven Proteinen, wie CARP, Ankrd2 und Tcap-MLP an die I-Bande und Z-Scheibe von Titin, der Interaktion mit dem Myosin- und Aktinfilament, sowie der passiven Dehnung in der I-Bande wurde eine Dehnungssensorfunktion für Titin postuliert. Die Kinasedomäne in der M-Bande von Titin könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. Mit Hilfe eines Flex Cell Systems könnten isolierte Kardiomyozyten und Myozyten von Titinkinaseregion-KO-Tieren gedehnt und mögliche Veränderungen im Protein- oder Expressionsmuster durch 2D-Gelelektrophorese bzw. Microarray-Analyse identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen auf eine wichtige Funktion der Titinkinaseregion in Hypertrophie- und Atrophieprozessen im Herz- und Skelettmuskel hin. Die klinische Relevanz wird durch die Identifikation unterschiedlicher Titin-Mutationen in Patienten mit Muskeldystrophie und Kardiomyopathien unterstrichen. Weitere Untersuchungen zur Pathophysiologie der Titin-Signaltransduktion könnten helfen, neue therapeutische Strategien zur Behandlung von Herz- und Muskelerkrankungen zu entwickeln.

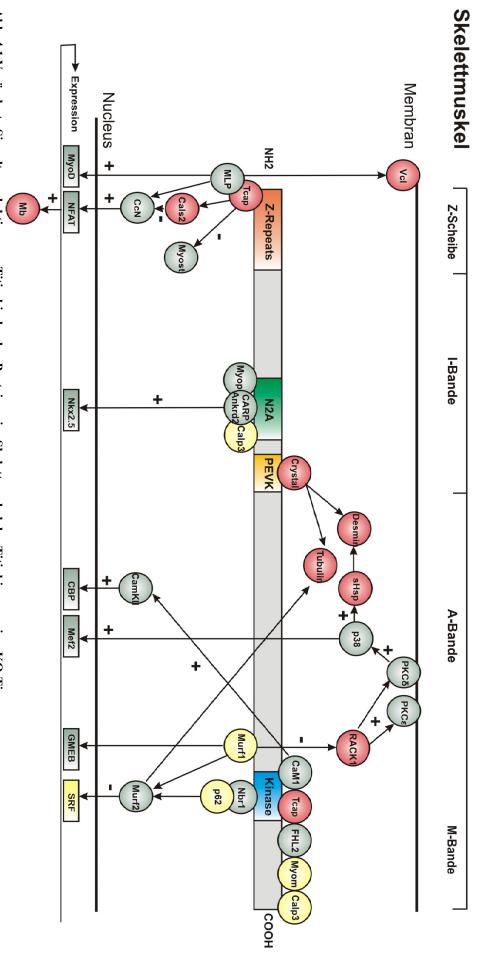


Abb. 4.1 Veränderte Signaltransduktion von Titin-bindenden Proteinen im Skelettmuskel der Titinkinaseregion-KO-Tiere

Calmodulin 1, sHSP-small Heat schock proteins, Vcl-Vinculin, Myom-Myomesin Myop-Myopalladin, Mb-Myoglobin, CcN-Calcineurin, Cals2-Calsarcin2, Myost-Myostatin, MLP-Muscle LIM Protein, Cryst-αB-Crystallin, Calp3-Calpain3, CaM1aufwiesen. Dabei repräsentieren rote Kreise hochregulierte-, grüne-runterregulierte- und gelbe-unveränderte Proteine. Grau eingekreiste Proteine wurden nicht überprüft Dargestellt sind alle Titin-bindenden Proteine, sowie deren Interaktionspartner, die veränderte RNA- oder Proteinmengen im Skelettmuskel der Titinkinaseregion-KO-Tiere

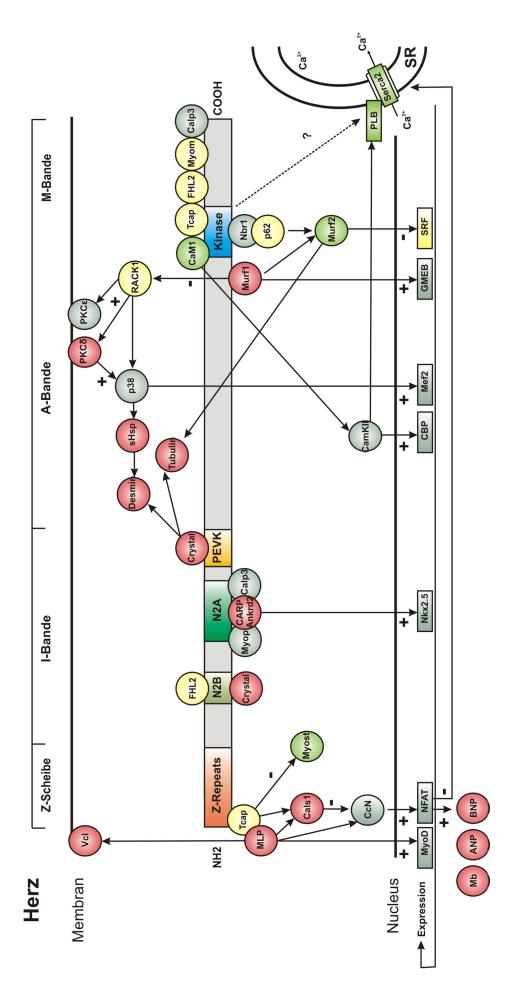


Abb. 4.2 Veränderte Signaltransduktion von Titin-bindenden Proteinen im Herz der Titinkinaseregion-KO-Tiere

Dargestellt sind alle Titin-bindenden Proteine, sowie deren Interaktionspartner, die veränderte RNA- oder Proteinmengen im Skelettmuskel der Titinkinaseregion-KO-Tiere Myop-Myopalladin, Mb-Myoglobin, CcN-Calcineurin, Cals1-Calsarcin1, Myost-Myostatin, MLP-Muscle LIM Protein, Cryst-αB-Crystallin, Calp3-Calpain3, CaM1aufwiesen. Dabei repräsentieren rote Kreise hochregulierte-, grüne-runterregulierte- und gelbe-unveränderte Proteine. Grau eingekreiste Proteine wurden nicht überprüft. Calmodulin 1, PLB-Phospholamban, sHSP-small Heat schock proteins, Vcl-Vinculin, Myom-Myomesin, SR-sarkoplasmatisches Retikulum