

Alexander Mues

Dr. med.

Klonierung, Sequenzierung und zellbiologische Charakterisierung von Telethonin und der humanen kardialen Myosin-Leichtketten-Kinase - Implikationen für genetisch bedingte Myopathien

Geboren am 09.11.1972 in Aachen

Reifeprüfung am 13.06.1992 in Wuppertal

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis SS 2000

Physikum am 21.03.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Kansas City, KS, USA

Staatsexamen am 25.05.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

Dopktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. M. S. Gautel

Zelluläre Regulationsmechanismen im quergestreiften Muskel lassen sich prinzipiell in zwei Kategorien einteilen: in solche, die den Prozess der Kontraktion initiieren und modulieren, und solche, die einen geordneten Aufbau des Sarkomers ermöglichen, indem sie räumlich und zeitlich definiert Interaktionen zwischen Proteinen vermitteln.

Störungen im Zusammenspiel der beteiligten Proteine führen zu charakteristischen Krankheitsbildern: Kardiomyopathien und Reizleitungsstörungen im Herzen, Muskeldystrophien und Myotonien im Skelettmuskel seien als die am häufigsten vorkommenden genannt. Mischformen kommen bei Koexpression in beiden Geweben vor (Beispiel: Herzmuskelbeteiligung bei Muskeldystrophie Typ Duchenne).

Die vorliegende Arbeit hatte zwei Ziele: zum einen sollten der oder die Bindungspartner identifiziert werden, die mit dem größten bekannten, muskelspezifischen Protein Titin in der Z-Scheibe interagieren. Titin wird als eines der ersten Proteine während der Myofibrillogenese exprimiert und koordiniert in mehreren Sarkomerabschnitten den Einbau anderer Strukturproteine. Elektronenmikroskopische Studien zeigen, dass die Entstehung des Sarkomers von der Z-Scheibe ihren Ausgang nimmt. Es lag also nahe zu vermuten, dass Titin maßgeblich am Aufbau der primitiven embryonalen Z-Scheibe und der frühen Sarkomerentstehung beteiligt ist.

Der zweite Teil der Dissertation hatte die Klonierung, Sequenzierung und biochemische Charakterisierung einer Kinase zum Ziel, die als 'Verunreinigung' bei Präparationen von Myosin-bindendem Protein-C aus Herzmuskelgewebe mit extrahiert wurde (Gautel et al., 1995).

Unter Verwendung eines Protein-Protein Interaktionsassays (Zwei-Hybrid-Assay) konnte das bis dahin unbekannte, nur im Herz- und Skelettmuskel exprimierte Protein Telethonin als Bindungspartner der beiden *N*-terminalen Ig-ähnlichen Domänen Titins, Z1-Z2, identifiziert werden. Telethonin ist ein 167 Aminosäuren langes Peptid, das keine Homologien mit bisher bekannten Proteinen aufweist und im Vergleich zum Herzmuskel im Skelettmuskel in etwa 4 - 5-facher Menge exprimiert wird.

Die Bindung an Titin und die subzelluläre Lokalisation in der Z-Scheibe konnten *in vitro* beziehungsweise, nach Herstellung eines polyklonalen Antikörpers, in der Immunfluoreszenz bestätigt werden.

Wie weitere Zwei-Hybrid-Assays zeigen konnten, interagiert Telethonin nicht mehr mit einem längeren (rekombinanten) *N*-terminalen Fragment Titins, das mehrere Phosphorylierungsstellen für differenzierungsabhängige Kinasen enthält. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion zwischen Titin und Telethonin entwicklungsabhängig ist und die Bindungsstelle für Telethonin im inaktivierten Zustand blockiert ist.

Der *N*-Terminus Telethonins enthält eine Konsensussequenz für Serin/Threonin-gerichtete Proteinkinasen. *In vitro* Versuche mit einem rekombinanten, aktiven Fragment der Titinkinase, die Bestandteil der M-Banden-Sequenz Titins ist, konnten nachweisen, dass Telethonin selektiv am Serinrest 157 durch diese phosphoryliert wird. Phosphorylierungsexperimente mit Zellextrakten aus mit der funktionellen Titinkinase transfizierten Myoblastenkulturen (= in Differenzierung befindliche Muskelzellen) identifizierten ebenfalls Telethonin, während in adulten Muskelzellen keine entsprechende Kinaseaktivität mehr beobachtet werden konnte.

Mit gegen den *C*-Terminus Titins gerichteten Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Kinasedomäne während früher Stadien der Myofibrillogenese sowohl mit dem *N*-Terminus Titins als auch mit Telethonin in punktförmigen Aggregaten, die später die Z-Scheibe konstituieren, kolokalisiert ist.

Kürzlich wurden Mutationen im Telethonin-Gen entdeckt, die zur Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2G führen (Moreira et al., 2000). Sie resultieren in *C*-terminal um circa 110 Aminosäuren trunziertem Telethonin, dem damit die Phosphorylierungsstelle fehlt. Die vorliegende Arbeit liefert somit eine erste Erklärung zum Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung.

Telethonin erfüllt mit seiner offensichtlich bimodalen Funktion als sarkomerisches Strukturprotein einerseits und als Signaltransduktionsmolekül andererseits eine wichtige Rolle in der Herz- und Skelettmuskelentwicklung. Es unterscheidet sich dadurch

grundlegend von anderen sarkomer-assoziierten Proteinen wie zum Beispiel Myosin, Troponin oder C-Protein.

Ausgehend von der These, dass die mit dem kardialen Myosin-bindenden Protein C – assoziierte Kinase der MLCK-Familie angehört, wurde zunächst eine Datenbanksuche mit der katalytischen Domäne der skelettalen MLCK (*Oryctolagus cuniculus*) durchgeführt. Dabei wurde ein herzmuskelspezifisches Transkript mit hoher Homologie (> 90%) zur skelettalen MLCK identifiziert. Per PCR konnte es aus einer humanen Herzmuskel-cDNS-Bibliothek reproduziert werden. Ein Northern Blot bestätigte, dass es Teil eines circa 8 kb großen Transkripts ist, welches neben einer schwachen Expression im Skelettmuskel fast ausschließlich in kardialen Gewebe vorkommt. Die Klonierung und Sequenzierung der cMLCK-cDNS ergab ein offenes Leseraster von 2853 bp mit einem vorhergesagten Protein von 951 Aminosäuren Länge. Im Western Blot konnte mit einem polyklonalen Antikörper gegen den sequenzspezifischen N-Terminus in Herz- und Skelettmuskel ein \approx 95 kDa großes Protein detektiert werden. Dies stimmt mit der vorhergesagten Größe und Gewebeverteilung überein.

Nach Expression der funktionell aktiven, rekombinanten katalytischen Domäne in einem Drosophilazelleexpressionssystem konnte die hcMLCK in Phosphorylierungsassays untersucht werden.

Sie phosphoryliert Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig das cMyBP-C, kardiale Regulatorische Myosin-Leichtketten und das kardiale Troponin I und ist damit die einzige bekannte MLCK, die mehr als ein Substrat besitzt. Die Interaktion ist zumindest in Bezug auf das cMyBP-C hoch spezifisch: Versuche mit Inaktivierungsmutanten konnten zeigen, dass präferenziell das mittlere von drei Serinen innerhalb der kardial-spezifischen Insertionssequenz phosphoryliert wird.

Schließlich bestätigte die Sequenzierung von Peptidfragmenten aus cMyBP-C – Präparationen, dass es sich bei der assoziierten Kinase tatsächlich um die hier klonierte cMLCK handelt.

Mittels Datenbanksuche wurde eine genomische Sequenz von Chromosom 16q12 gefunden, die das komplette cMLCK-Gen enthält (die Autoren der nur im Internet veröffentlichten Sequenz konnten dieses nicht identifizieren).

Die kodierende Sequenz setzt sich demnach aus 13 Exons zusammen, die von 12 Introns mit einer Gesamtlänge von \approx 38 kb unterbrochen werden.

Die hcMLCK ist das erste Kandidatengen für die autosomal dominant vererbte FHC 7, bei der eine *fragile site* auf Chromosom 16q beschrieben wurde. Entsprechende genetische Untersuchungen zum Nachweis der Mutation(en) sind bereits angelaufen.