

Michael Kulke
Dr. sc. hum.

Funktionsanalyse an Sarkomeren und Molekülen quergestreifter Muskulatur zur Aufklärung der physiologischen Rolle von Proteinen der Titin-Familie

Geboren am 26.06.1970 in Ludwigshafen am Rhein
Reifeprüfung am 07.06.1989 in Ludwigshafen am Rhein
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1990/91 bis WS 1998/99
Vordiplom am 25.01.1994 an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Diplom am 16.12.1998 an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Promotionsfach: Physiologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Linke

Die quergestreifte Muskulatur von Insekten und Vertebraten verfügt über Strukturen, die unabhängig von Aktin und Myosin bei Dehnung eine (passive) Rückstellkraft erzeugen. In Präparaten einzelner Myofibrillen wird diese Kraft durch die Proteine des dritten Filamentsystems erzeugt, denen ein Aufbau aus Ig-Domänen gemeinsam ist. Im indirekten Flugmuskel (IFM) von *Drosophila* handelt es sich um Kettin und Projectin, im Vertebraten-Muskel um Titin. Titin durchspannt ein komplettes Halbsarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie. Der funktionell steife A-Band-Anteil ist in verschiedenen Muskeltypen weitgehend konserviert, während der I-Band-Anteil in verschieden langen Isoformen exprimiert wird und aus zwei Hauptabschnitten, Ig-Domänen-Regionen und der PEVK-Region, besteht. Da kardiale Titin-Isoformen kürzere Ig-Domänen-Abschnitte und PEVK-Regionen als skelettale Isoformen besitzen, verfügt der Herzmuskel über eine steilere Ruhedehnungskurve als der Skelettmuskel. Eine noch höhere Steifigkeit weist der IFM von *Drosophila melanogaster* auf. Eine hohe Steifigkeit ist notwendig für die Eigenschaft, auf passive Dehnung mit aktiver Kontraktion zu antworten ("Dehnungsaktivierung"). Für den Herzmuskel von Vertebraten, vor allem aber für den IFM von Insekten, ist die Dehnungsaktivierung funktional von großer Bedeutung. Als molekulare Determinanten der hohen Steifigkeit des *Drosophila*-IFM sah man vor Beginn dieser Arbeit ausschließlich die "connecting filaments" an, die als I-Band-durchspannende Filamente Projectin enthalten. Kettin hingegen wurde als rein Aktin- und α -Aktinin-bindendes Protein verstanden, welches die Aktin-Filamente stabilisiert und in der Z-Scheibe verankert ist.

Zur Aufklärung der Funktion des Kettins in Myofibrillen von *Drosophila m.* wurden Immunmarkierungsexperimente mit mechanischen und biochemischen Analysen kombiniert. Immunfärbung mit verschiedenen anti-Kettin-Antikörpern ergab in normalen Myofibrillen eine Markierung der Z-Scheiben-Region. In aktinextrahierten Myofibrillen wurde mit den gleichen Antikörpern neben der Z-Scheiben-Region ein weiteres Epitop am A-Band-Ende angefärbt. Immunmarkierungen der A-Band-Enden traten auch nach selektiver Spaltung des Kettins durch μ -Calpain auf. Im Gegensatz dazu wurde das Färbemuster des Projectins durch Aktin-Extraktion bzw. Behandlung mit μ -Calpain nicht beeinflusst. In Kraftmessungen an einzelnen relaxierten Myofibrillen des IFM von *Drosophila m.* konnte gezeigt werden, dass die passive Steifigkeit der Myofibrillen

schon Sekunden nach Beginn der Aktin-Extraktion dramatisch abnimmt. Die Amplitude des Steifigkeits-Abfalls war bei Aktinextraktion ähnlich groß wie die bei Degradation des Kettins (durch μ -Calpain) erreichte Amplitude. Die Bindung eines C-terminalen Kettin-Konstrukts an Myosin konnte im Dotblot bewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Steifigkeit des IFM von *Drosophila m.* von einer Verbindung der Aktin- und Myosin-Filamente durch Kettin abhängt. Höchstwahrscheinlich leistet auch Projectin einen Beitrag zur myofibrillären Steifigkeit. Zusammen sorgen diese beiden Riesenproteine der Titin-Familie für die zur Dehnungsaktivierung benötigte hohe Steifigkeit des IFM. Im Western Blot wurde außerdem das Vorhandensein von Kettin-Isoformen verschiedener Länge demonstriert. Durch die Expression verschiedener Isoformen könnte die myofibrilläre Steifigkeit je nach Insekten-Muskeltyp moduliert werden.

Die in nicht-aktivierten Skelett- und Herzmuskelpräparaten gemessene Kraftantwort auf Dehnung setzt sich aus elastischen und viskösen/viskoelastischen Komponenten zusammen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die molekulare Basis der kardialen Viskosität etwas mit der Funktion des Titins zu tun hat. Im sogenannten Aktin-Myosin-*in-vitro* Motilitäts-Assay inhibierten klonierte PEVK-Titin-Konstrukte die Aktin-Filament-Gleitgeschwindigkeit konzentrationsabhängig, wobei kardiales PEVK-Titin einen stärkeren Effekt als skelettales PEVK-Konstrukt hatte. Titin-Konstrukte aus anderen Regionen des I-Band-Titins zeigten keinerlei Effekt. Für die aus diesen Befunden ableitbare PEVK-Titin/Aktin-Interaktion wurde eine Temperatur- und Ionenstärke-Abhängigkeit nachgewiesen, die auf hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen hindeutet.

Die Verminderung der Aktin-Filament-Gleitgeschwindigkeit durch kardiales PEVK-Konstrukt wurde bei Vorhandensein von Ca^{2+} teilweise aufgehoben. Dies deutet auf eine Modulation der Aktin-Titin-Interaktion hin. Sowohl die Interaktion der PEVK-Region mit Aktin, als auch deren Ca^{2+} -Abhängigkeit, konnte für kardiales PEVK im Kosedimentations-Assay bestätigt werden. Die physiologische Relevanz dieser Interaktion wurde durch Kraftmessungen an nicht-aktivierten Kardiomyofibrillen aufgezeigt. Nach einer schnellen Dehnung der Myofibrillen wurde Stressrelaxation - eine Abnahme der Spannung bei konstanter Sarkomerlänge - beobachtet. Dieser Abfall der Spannung konnte mit einer exponentiellen Funktion dritter Ordnung parametrisiert werden. Für die dominierende, schnellste Komponente des Spannungsabfalls wurde eine Zeitkonstante von 4-5 ms und eine Amplitude von 40-50 % der Gesamtamplitude ermittelt. Dieser erste, schnelle Spannungsabfall verminderte sich sofort nach Zugabe von (Ca^{2+} -unabhängig wirksamem) Gelsolinfragment, während sich das am Ende der Halteperiode erreichte Spannungsniveau erst nach längerer Inkubation mit Gelsolin veränderte. Hingegen verminderten sich sowohl die schnelle visköse Spannungskomponente als auch das finale Spannungsniveau sofort und mit gleichem zeitlichen Verlauf, wenn Titin mittels niedriger Trypsinkonzentrationen selektiv proteolysiert wurde. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die PEVK-Aktin-Interaktion im kardialen Sarkomer unter physiologischen Bedingungen auftritt und einen viskösen Widerstand bei Sarkomerlängenveränderung bewirkt. Möglicherweise kommt es im erkrankten Herzgewebe aufgrund veränderter Titinexpression zu Veränderungen der Aktin-Titin-Bindungseigenschaften, die sich in veränderten mechanischen Eigenschaften des Herzens manifestieren könnten.