



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Etablierung transgener Tiermodelle zur Charakterisierung der in vivo Funktionen von Nebulin und Titin sowie deren Beteiligung bei Muskeldystrophien

Autor: Christoph Burkart
Institut / Klinik: Institut für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Doktorvater: Prof. Dr. S Labeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte erfolgreich ein transgenes Tiermodell für das Muskelprotein Nebulin entwickelt werden. Zur Generierung eines konventionellen Knock outs wurde der Targeting-Vektor homolog in das murine Nebulin-Gen integriert, wodurch der Leseraster des Proteins in Exon 1 zerstört wurde. Nach der Transformation in ES-Zellen, der erfolgreichen Selektion rekombinanter Klone sowie anschließender Blastozysteninjektion wurde eine KO-Maus gewonnen. Die eingehende Phänotypisierung dieser Maus über RT-PCR, SDS-PAGE und Western Blot Studien zeigte, dass die Transkription bzw. Translation von Nebulin vollständig ausgeschaltet wurde. Wenige Tage nach der Geburt können die KO-Mäuse aufgrund der verringerten Größe deutlich von ihren Geschwistern unterschieden werden. Zunächst sind die Nebulin KO-Tiere leicht dystrophisch, entwickeln aber innerhalb der ersten zwei Lebenswochen eine ausgeprägte Myopathie. Vermutlich infolge einer allgemeinen Muskelschwäche, die die Nahrungsaufnahme beeinträchtigt, sowie aufgrund respiratorischer Probleme, bedingt durch eine gestörte Funktion des Diaphragma, sterben die KO-Mäuse vor Tag 21. Bemerkenswert ist, dass bei ultrastrukturellen Untersuchungen der Skelettmuskeln von Nebulin KO-Mäusen nemaline Einschlusskörper identifiziert werden konnten, die denen von NM Patienten sehr ähnlich sind. Zusammen mit der Tatsache, dass Mutationen im Nebulin Gen bereits mit der NM in Verbindung gebracht wurden, kann man die NEB KO-Maus als Tiermodell für die nemaline Myopathie betrachten.

Für das Titin liegen bisher keine gut manipulierbaren murinen Modelle vor, da ein konventionaler Knock out zu embryonaler Lethalität führt, und ein CreLoxP-System vergleichsweise aufwendig ist. Da das *s/s* Gen als vermeintliches Titin Homolog in Invertebraten gilt, wurde dieses Gen in einem zweiten Teil dieser Doktorarbeit ausführlich charakterisiert, um es dann gezielt in *D. melanogaster* auszuschalten. Bei der Durchmusterung des *s/s* Gens nach Spleißisoformen stellte sich jedoch heraus, dass der *s/s* Locus kein Sarkomer-umspannendes Protein kodiert und damit funktional nicht in enger Beziehung zum Vertebraten-Titin steht. Daraufhin wurde dieser Ansatz nach Erstellung eines ausführlichen Spleißmodells des SIs Proteins konsequent verlassen. Um dennoch funktionelle Einblicke in das Titin zu gewinnen, wurden Interaktionen des N-terminalen Titins mit Hilfe des Hefe-Doppelhybridsystems charakterisiert. Interessanterweise konnte beim Durchmustern einer Skelettmuskel-cDNA-Bank Nebulin als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden, was anschließend über unabhängige Methoden bestätigt werden konnte. Die Tatsache, dass die für diesen YTH Screen verwendete Titin Sequenz in der Z-Scheibe liegt und die Nebulin KO-Maus über pathologische Z-Scheiben verfügt, unterstreicht die Bedeutung Nebulins für die Organisation der Z-Scheibe. Außerdem wurde beim Durchmustern einer Glattmuskel-cDNA-Bank mit der identischen Titin Sequenz Filamin als potentieller Bindungspartner identifiziert. Diese hier erstmals beschriebene Interaktion spricht dafür, dass das Z-Scheiben Titin die Myofibrille über Filamin mit dem subkortikalen Aktinzytoskelett und der Zellmembran vernetzt. Diese Verbindungen sind insbesondere bei Muskeldystrophien betroffen, weshalb diese Erkenntnisse weitere histopathologische Studien stimulieren werden.