

Ciprian Neagoe  
Dr. sc. hum.

## **Biochemische und Mechanische Untersuchung der kardialen Titin-Isoformen**

Geboren am 09.10.1973 in Câmpina, Rumänien  
Reifeprüfung am Juni 1992 in Câmpina, Rumänien  
Studiengang der Fachrichtung Physik vom WS 1992/93 bis SS 1998  
Diplom im Juni 1997 an der Universität von Bukarest, Rumänien  
Master in Physik (Vertiefte Studien in Biophysik), Juni 1998 an der Universität von Bukarest, Rumänien

Promotionsfach: Physiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Linke

**Hintergrund:** Titin ist ein riesiges elastisches Protein der Muskelsarkomere. Titin-Moleküle verbinden die Z-Scheibe mit der M-Linie und haben strukturelle, elastische und Signalfunktionen in den Myozyten. Die Primärstrukturermittlung einiger Titinisoformen und die mechanische Charakterisierung verschiedener Muskelgewebe zeigten, dass die Titinelastizität durch differenzielles Spleißen der Titin-Federregion moduliert wird, indem unterschiedlich lange Segmente eingebaut werden bestehend aus Immunglobulin-artigen Domänen, einer so genannten PEVK-Region und größeren einzigartigen Sequenzinsertionen wie N2-B. Das Molekulargewicht einer Titinisoform korreliert mit seinen Federeigenschaften: je kleiner (kürzer) die Isoform, desto steifer die Feder. Die Herzmuskeln von Säugern koexprimieren zwei Haupt-Titinisoformen, das steife N2B-Titin und das weniger steife N2BA-Titin. Die Sarkomer-Steifigkeit wird durch Einstellung des Expressionsverhältnisses von N2BA zu N2B justiert, während die Gesamttitinmenge in einem Sarkomer wohl aufgrund stöchiometrischer Restriktionen konstant ist.

**Zielsetzungen der Arbeit:** 1) Ermittlung des Titinisoformenexpressionsmusters in verschiedenen Muskelgeweben unter Verwendung von hochauflösender Gelelektrophorese und Western blot; 2) Aufzeigen der funktionalen Bedeutung der Expression verschiedener Herztitinisoformen; 3) Analyse möglicher Veränderungen in der Expression des Herztitins im kranken Myokard; 4) Etablierung von Faktoren, die für das Herz-Titinexpressionsmuster relevant sind; 5) Verstehen der Konsequenzen der pathologischen Änderungen in der Titinexpression für das kranke Herz.

**Methoden und Ergebnisse:** Das N2BA:N2B Titinisoformenverhältnis wurde durch Elektrophorese unter Verwendung besonders poröser Polyacrylamidgele bestimmt. Das Titinisoformenverhältnis war unterschiedlich: 1) in den Herzen von verschiedenen Säugetier-Species; 2) in verschiedenen Regionen des gleichen Herzens; und 3) in kranken gegenüber normalen menschlichen Herzen. Western Blots unter Verwendung sequenzspezifischer Titinantikörper bestätigten die Identität der Titinbanden. Der N2BA-Anteil schwankte von ~5% im linken Ventrikel der Ratte bis nahezu 70% im rechten Ventrikel der Kuh. Das N2BA:N2B Verhältnis war im Allgemeinen im rechten Ventrikel größer als im linken Ventrikel und war an der Herzbasis leicht höher als an der Herzspitze ein und desselben Herzens (untersucht in Ziege und Kaninchen). Das Titinisoformenmuster war in kranken humanen Herzen verändert: in wegen Koronararterienkrankheit (CAD) transplantierten Herzen bestand ein durchschnittliches N2BA:N2B Verhältnis von 47:53, während normale Spenderherzen ein Verhältnis von ~30:70 zeigten. Ein erhöhter Expressionsanteil der größeren N2BA-Titinisoform wurde auch in den

Herzen von Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) beobachtet.

Eine Koexpression von N2BA- und N2B-Titin im gleichen Sarkomer wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt. Ein regelmäßiges quergestreiftes Färbemuster für Titin auf Gewebeabschnitten von CAD-Herzen deutete auf eine uniforme Veränderung der Titinexpression hin, nicht aber auf strukturelle Schäden im Titin. Die funktionale Bedeutung der beobachteten Titinexpressionsveränderungen wurde in mechanischen Experimenten mit isolierten Myofibrillen menschlicher Herzen untersucht. Kranke Myofibrillen (CAD, DCM) mit erhöhtem N2BA-Anteil offenbarten eine abgesenkte passive Steifigkeit im Vergleich mit Myofibrillen aus normalen Donorherzen. Die Sarkomere konnten also ihre passive Spannung ändern, indem sie das N2BA:N2B Expressionsverhältnis modulierten. Insuffiziente humane Herzen haben demzufolge, selbst wenn sie global versteift sind (Kollagen hochreguliert), schlaffere Myofibrillen als normale menschliche Spenderherzen.

Eine Titinisoformenveränderung wurde auch an einem Rattmodell mit experimentellem Myokardinfarkt nach LAD-Ligatur untersucht. Titingele zeigten, dass 43% der kranken Herzen eine eindeutige N2BA-Bande aufwies, während nur 14% der Herzen Sham-operierter Tiere eine N2BA-Bande zeigten. Die Befunde demonstrierten, dass in diesem Tiermodell eine Titin-Isoformenveränderung hin zu N2BA induzierbar war.

**Schlussfolgerungen:** Eine verbesserte Titinisoformendetektion durch Verwendung niedrigprozentiger (2%) SDS-Polyacrylamid-Gele offenbarte das Vorhandensein vieler verschieden großer Titinisoformen in unterschiedlichen Muskelgeweben. Die Arbeit dokumentiert die elastische Vielfalt des Titins sowie deren Veränderungen bei menschlichen Herzerkrankungen und in der Entwicklung. Die Veränderung hin zu schlaffen N2BA-Isoformen im terminal insuffizienten humanen Herzen beeinflusst die mechanischen Eigenschaften der Kardiomyozyten, insbesondere deren passive Steifigkeit. Die krankheitsbedingte Verschiebung im Titinisoformenverhältnis könnte auch die Kontraktilität verschlechtern, indem z.B. die Fähigkeit des Herzens, den Frank-Starling-Mechanismus zu verwenden, behindert wird.