

Sebastian Spaich (geb. Busch)
Dr. med.

Fbxl22 – Charakterisierung eines neuen herzspezifischen F-box Proteins

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Norbert Frey

Die im Rahmen der myokardialen Plastizität und Homöostase zunehmend als bedeutsam erkannte Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems impliziert die Notwendigkeit präzise regulierter zellulärer Mechanismen, die eine substratspezifische Ubiquitylierung und Degradation fehlgefalteter oder beschädigter Proteine gewährleisten. Myokardspezifische Komponenten dieser Mechanismen und Signalwege sind allerdings bisher weitgehend unbekannt und unverstanden.

Aus diesem Grund wurde eine "In silico"-Analyse der EST-Datenbank vorgenommen, deren Ziel es war, potentiell kardiospezifische Expressionsmuster der annotierten F-box Proteine zu identifizieren. Im Rahmen der Untersuchungen konnte Fbxl22 als ein F-box Protein mit hohem Grad an Herzspezifität in Bezug auf das Gewebeexpressionsmuster identifiziert werden, sodass aufgrund dieses postuliert myokardspezifischen Expressionsmusters die Bezeichnung MYFbx (Myocardial F-box protein) gewählt wurde.

Die herzspezifische Expression von Fbxl22/MYFbx konnte sowohl in Multiple Tissue Northern und Western Blots der Maus als auch in der quantitativen Realtime-PCR einer humanen cDNA-Bank validiert werden.

Im Zuge der Grundcharakterisierung dieses kardialen F-box Proteins zeigte sich in der Analyse der Proteinsequenz multipler Spezies ein hohes Maß an evolutionärer Konservierung. Besonders der N-terminale Anteil von Fbxl22/MYFbx, in dem die F-box Domäne lokalisiert ist, zeigt sich im Sequenzvergleich fast vollständig homolog.

Um die funktionelle Bedeutung von Fbxl22/MYFbx im Myokard zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt die subzelluläre Lokalisation von Fbxl22/MYFbx *in vitro* und *in vivo* analysiert. Sowohl in Immunofärbungen neonataler und adulter Rattenkardiomyozyten (NRVCM/ARVCM) als auch in Kryoschnitten muriner Wildtyp-Herzen konnte mithilfe eines MYFbx-spezifischen Antikörpers und einer Gegenfärbung mit Calsarcin-1, einem bekannten Z-Scheiben-Protein, eine Lokalisation von Fbxl22/MYFbx im Bereich des Sarkomers an der myokardialen Z-Scheibe demonstriert werden.

Um potentielle kardiale Interaktionspartner von Fbxl22/MYFbx zu detektieren, wurde ein Yeast two-hybrid screen mit Fbxl22/MYFbx als „bait“ durchgeführt. Im Rahmen dieser Yeast

two-hybrid Analyse ließen sich Interaktionen von Fbxl22/MYFbx mit Skp1 (S-Phase associated Kinase 1) sowie mit den Z-Scheibe-assoziierten Proteinen α -Actinin-2 und Filamin C nachweisen.

In der Coimmunopräzipitation konnte die im Yeast two-hybrid Experiment identifizierte Interaktion von Fbxl22/MYFbx mit Skp1 sowie eine Bindung von Cullin, zwei kritischen Komponenten der SCF (Skp1/Cul1/F-Box) - E3-Ligasen, bestätigt bzw. demonstriert werden. Des Weiteren wurden von den im Yeast two-hybrid System detektierten, potentiellen Substraten die Z-Scheiben-Proteine α -Actinin-2 und Filamin C als Bindungspartner von Fbxl22/MYFbx in Coimmunopräzipitations-Studien verifiziert. In weiteren Experimenten zur Eingrenzung der Interaktionsdomänen konnte gezeigt werden, dass der hoch-konservierte N-terminale Teil von Fbxl22/MYFbx (AS 1-113) für die Interaktion mit Skp1, α -Actinin-2 und Filamin C hinreichend ist. Des Weiteren wurde der Nachweis erbracht, dass für die Interaktion mit Fbxl22/MYFbx ein C-terminales Fragment von Filamin C ausreichend ist.

In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass es sich bei den Z-Scheiben-assoziierten Bindungspartnern um Substrate eines SCF-Komplexes mit Fbxl22/MYFbx als beteiligtem F-box Protein handeln könnte, führte die in vitro - Überexpression von Fbxl22/MYFbx dosisabhängig zu einer Degradation beider postulierter Substrate. Umgekehrt attenuierte eine simultane Proteasom-Inhibition mit MG-132 die Degradation signifikant.

Die Demonstration einer Fbxl22/MYFbx-vermittelten und -dosisabhängigen Ubiquitylierung von α -Actinin-2 und Filamin C erbrachte den Beweis, dass es sich bei Fbxl22/MYFbx funktionell um ein F-box Protein mit Beteiligung an einer kardialen SCF-Ligase handelt und es sich bei den identifizierten Interaktionspartnern α -Actinin-2 und Filamin C um die ersten bekannten Substrate dieser ersten kardiospezifischen SCF-Ligase handelt.

Da für die Ubiquitylierung bereits eine wesentliche regulative Rolle in der kardialen Hypertrophie gezeigt werden konnte, wurden in der Folge gut etablierte Modelle pathologischer myokardialer Hypertrophie auf Fbxl22/MYFbx-Expression untersucht. Interessanterweise erwies sich Fbxl22/MYFbx sowohl in Phenylephrin (PE)-behandelten NRVCN als auch in mittels Aortenligatur druck- belasteten Mauserzen als signifikant herunterreguliert (PE-behandelte NRVCN: -79%, $p < 0.001$, Aortenligatur: -42%, $p < 0.05$).

Umgekehrt führte die adenoviral vermittelte Überexpression von Fbxl22/MYFbx zu einer deutlich attenuierten PE-vermittelten Induktion des hypertrophen Genprogramms mit einer Reduktion von ANF (-35%, $p < 0.05$), BNP (-58%, $p < 0.001$) und MCIP/RCAN1.4 (-67%, $p < 0.001$). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigte sich in Messungen der Zellgröße ferner eine signifikante Inhibition der kardiomyozytären Hypertrophie (Reduktion der Zellgröße: -23%, $p < 0.001$).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Rahmen dieser Dissertation das erste myokardspezifische F-box Protein, Fbxl22/MYFbx, identifiziert und als E3-Ligase charakterisiert werden konnte. Fbxl22/MYFbx vermittelt die Degradation von α -Actinin-2 und Filamin C und inhibiert die kardiomyozytäre Hypertrophie ebenso wie die Expression des hypertrophischen Genprogramms. Fbxl22/MYFbx könnte somit eine neue Komponente der anti-hypertrophen Signaltransduktion im Herzen sein. Um weitere Erkenntnisse zur Funktion von Fbxl22/MYFbx im Herzen gewinnen zu können und die in vitro gewonnenen Daten in vivo bestätigen zu können, wird aktuell eine Fbxl22/MYFbx-transgene Maus generiert.