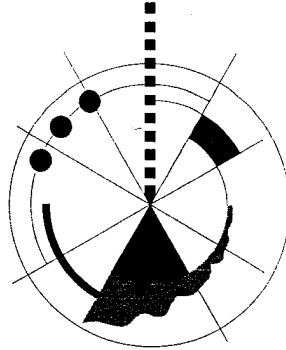


PHYSIOLOGIE

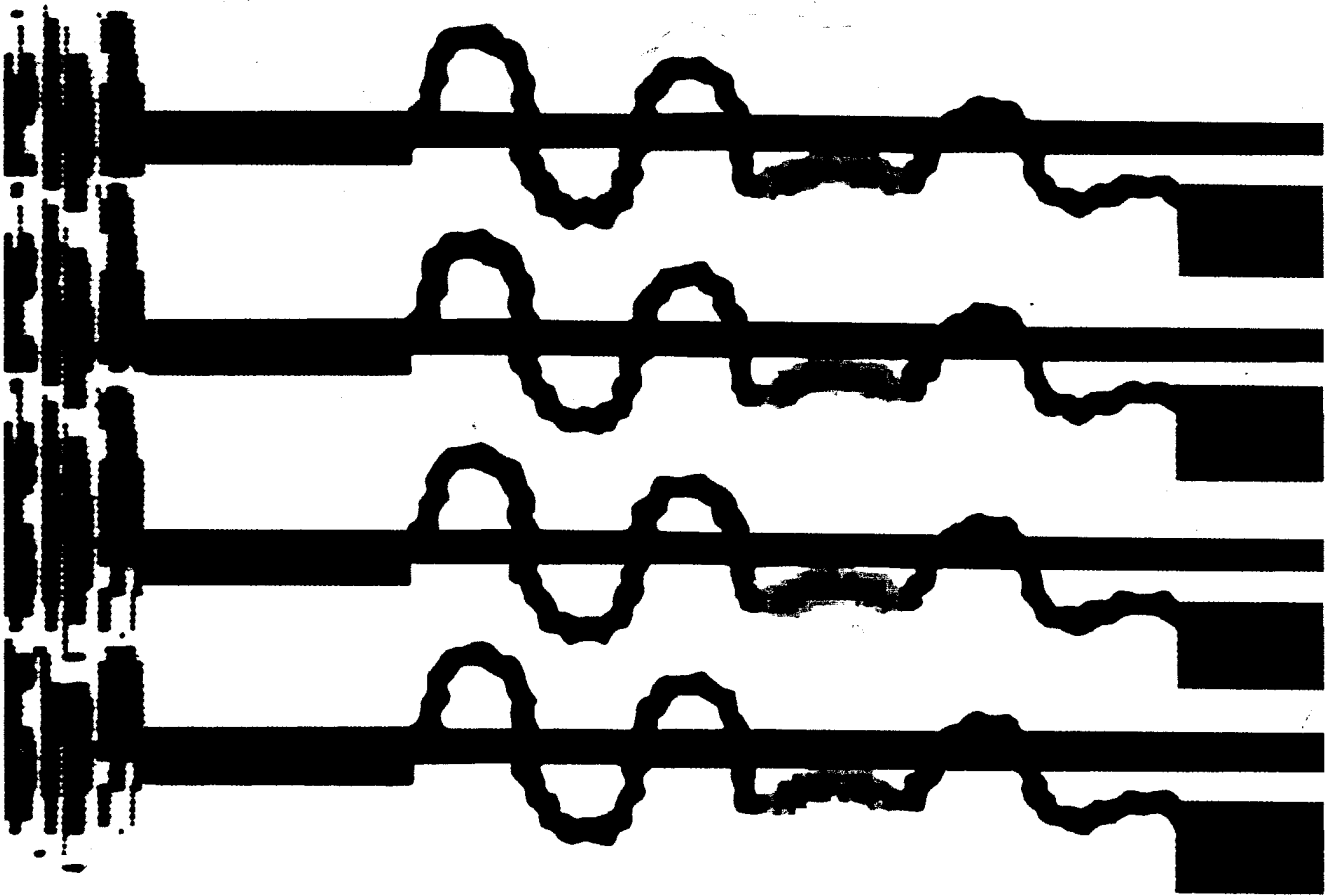
FORSCHUNG/LEHRE/ÖFFENTLICHKEIT

Zum Beginn • Arbeitsgruppe • In memoriam John C. Eccles • Essen: Evaluierung der Publikations-tätigkeit • WWW-Server der DPG • Aus der Forschung: Auf den Spuren Molekularer Federn – das Muskelprotein Titin • Aus der Lehre: Elektrokardiogramm im Physio-



*Eine Publikation der
Deutschen Physiologischen Gesellschaft,
Heft 10, Mai 1998*

logischen Praktikum • Aus der Lehre: Humanes transepitheliales Potential im Physiologischen Praktikum • Institute stellen sich vor: Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie in Göttingen • Menschen in der Physiologie: habilitiert und ernannt



**Titin:
Spannender Gigant im Muskel**



Auf den Spuren Molekularer Federn Genetische und mechanische Analyse des Muskelproteins Titin

Wolfgang A. Linke, Siegfried Labeit, J. Caspar Rüegg

Die für die Muskelkontraktion entscheidenden Prozesse der Energieumwandlung, die an dünnen und dicken Filamenten ablaufen, werden schon seit Jahrzehnten intensiv untersucht. Aber erst in den letzten Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, daß für die Funktion des quergestreiften Muskels ein drittes Filamentsystem essentiell ist, das aus riesigen elastischen Molekülsträngen, den Titinen, besteht. Titinfilamente sind als Stützproteine bedeutsam, tragen zur Aufrechterhaltung einer hohen aktiven Spannung bei isometrischer Kontraktion bei und sind vor allem für die passive Kraftentwicklung bei Dehnung relaxierter Muskelfasern verantwortlich. In verschiedenen Muskelgewebstypen werden Titine in spezifischen Isoformen exprimiert, wobei die Länge einer Isoform die charakteristische Ruhedehnungskurve eines Muskels bestimmt. Die molekulare Basis der Titinelastizität wird seit Bekanntwerden der Titin-Primärstruktur im Jahre 1995 intensiv erforscht, wobei durch Kombination biophysikalischer und molekularbiologischer Ansätze erste Einblicke in die Wirkungsweise dieser molekularen „Federn“ gewonnen werden konnten.

Herkunft der Muskelelastizität

Schon seit Jahrzehnten ist bekannt, daß bei Dehnung relaxierter Muskelfasern eine „passive“ Spannung entsteht (Ruhedehnungskurve), die entscheidend ist für die Fähigkeit des Muskels, sich nach Dehnung wieder bis auf die Ruhelänge zusammenzuziehen. Welche Strukturen allerdings für das Entstehen dieser passiven Spannung im Herz- oder Skelettmuskel verantwortlich sind, blieb lange Zeit umstritten. Frühe Arbeiten zur Elastizität des quergestreiften Muskels behaupten, daß die passive Spannung überwiegend von extrazellulären Strukturen wie Kollagenfasern und bindegewebigen Anteilen zwischen den Muskelfasern bestimmt wird. Allerdings zeigten Untersuchungen an sarkolemmfreien „skinned fiber“-Präparaten des Skelettmuskels bereits in den 50er Jahren, daß nach Entfernung des Sarkolemms der größte Teil der dehnungsabhängigen passiven Spannung bestehen blieb; diese Spannung mußte also durch die Elastizität intrazellulärer Strukturen

hervorgerufen worden sein. Es dauerte allerdings bis in die Mitte der 80er Jahre, bis allgemein anerkannt wurde, daß die Ruhedehnungskurve des Skelettmuskels in erster Linie durch die elastischen Eigenschaften der Myofibrillen selbst zustandekommt.

Auch für den Herzmuskel wurde mit Einführung des Einzelzellpräparates Mitte der 70er Jahre klar, daß zumindest ein Teil der passiven Spannung intrazellulären Ursprungs sein muß. Später konnte dann anhand von Dehnungsexperimenten mit einzelnen isolierten Kardiomyofibrillen gezeigt werden, daß bei kurzen bis mittleren physiologischen Sarkomerlängen (der Arbeitsbereich des Herzens reicht von ungefähr 1,7 bis 2,3 μm) vor allem die myofibrillären Elemente für die Ruhedehnungskurve selbst multizellulärer Myokardpräparate entscheidend sind (Linke et al., 1994). Erst bei Extensionen auf Sarkomerlängen über 2,2 μm bestimmen offensichtlich andere, steifere Strukturen (z.B. Kollagen) den dann einsetzenden steilen Anstieg der kardialen Ruhedehnungskurve und könnten somit zum Schutz des Myokards vor Überdehnung beitragen. Klar ist heute jedoch, daß die Myofibrillen im Herzmuskel ebenso wie im Skelettmuskel die unter Normalbedingungen wesentliche Komponente für die Entstehung der passiven Spannung darstellen.

Entdeckung des elastischen Muskelproteins Titin

Das Rätsel um die strukturelle Basis der Ruhedehnungskurven von Herz- und Skelettmuskelfibrillen wurde gelöst, als



das hochmolekulare filamentöse Sarkomerprotein Titin Ende der 70er Jahre entdeckt wurde (Maruyama et al., 1977; Wang et al., 1979). Da dieses Protein zunächst als Connectin – nach Maruyama – beschrieben worden war, existieren auch heute (leider) noch zwei gleichermaßen gültige Namen. Mit gewöhnlichen Gelelektrophoresen konnte das Titin nicht nachgewiesen werden, da es aufgrund seiner riesigen Größe nicht in Gelsysteme üblicher Porosität (6-12%) einläuft. Erst bei Verwendung großporiger Gele (2-3%) kommt dieses Protein als separate Bande weit über dem Myosin zur Darstellung. Nach anfänglichen Diskussionen um die hypothetische Molekülgröße des Titins, die zunächst aus dem Vergleich seiner Mobilität mit derjenigen oligomerisierter Myosinketten abgeschätzt wurde, einigte man sich auf etwa 3MDa. Somit ist Titin das größte bisher beschriebene Polypeptid und mit einem Anteil von etwa 10% an der Gesamtmuskelmasse nach Myosin und Aktin das dritthäufigste Muskelprotein. Es macht ungefähr 0,5 kg des Körpergewichts eines Erwachsenen aus.

Die Schlußfolgerung, daß Titinfilamente elastisch sind, beruhte ursprünglich auf den Ergebnissen immunhistochemischer Studien mit monoklonalen Titinantikörpern. Man fand, daß sich Titin-epitope aus dem I-Band-Bereich des Sarkomers (Abb. 1, *siehe ausklappbare Umschlagseite*) bei Dehnung einer Muskelfaser sowohl von der Z-Scheibe als auch vom Ende des A-Bandes hinweg bewegten. Hingegen blieben A-Band-Titinepitope stationär relativ zum A-Band-Zentrum. Damit war klar, daß der dehnbare Bereich des Titins im I-Band lokalisiert ist (Fürst et al., 1988). Außer-

dem wurde gezeigt, daß Degradation des Titins durch Proteasen oder ionisierende Strahlung mit einem Verlust der passiven Muskelspannung einhergeht. Zusätzlich wurde dabei auch eine starke Absenkung der kalziumaktivierten Kraft beobachtet, und dies wurde auf den Verlust der Zentrierung der dicken Filamente im Sarkomer zurückgeführt. Daher konnten dem elastischen Titinfilament Anfang der 90er Jahre drei wesentliche Funktionen zugeordnet werden: (1) Bestimmung der passiven Spannung und damit verbunden (2) Rückstellung des Sarkomers auf die initiale Länge nach moderater (physiologischer) Dehnung sowie (3) Aufrechterhaltung der aktiven Spannung bei isometrischer Kontraktion durch Positionieren der dicken Filamente im Zentrum des Sarkomers. Es soll hier weiterhin bemerkt werden, daß die elastischen „dritten Filamente“ durch Entwicklung einer hohen passiven Spannung bei starker Vordehnung des Muskels auch maßgeblich an der isometrischen Maximalkraft beteiligt sind. Vor allem im Herzmuskel unterstützen die Titinfilamente die Prozesse der kalziumabhängigen Muskelkontraktion (vgl. Rüegg, 1992) im physiologischen Arbeitsbereich, indem sie auch die Verkürzungsgeschwindigkeit wesentlich mitbestimmen.

Molekulare Beschreibung des Titins

Die Lage der Titinfilamente im Sarkomer ist aus (Abb. 1) ersichtlich: Ein Titinmolekül erstreckt sich über die gesamte > 1µm lange Distanz eines Halbsarkomers von der Z-Scheibe bis zur M-Linie (Fürst et al., 1988). Der Carboxy-Terminus des Titinfilaments ist über Interaktionen mit anderen Proteinen in der M-Linie verankert, während der Amino-Terminus in der Z-Scheibe liegt (Labeit et al., 1992). Es konnte nachgewiesen werden, daß die Megadalton-Masse des Titins nicht etwa ein Polymerisationsprodukt vieler kleiner Protein-Unterein-

heiten ist, sondern auf der Expression einer einzelnen, extrem großen Polypeptidkette beruht (Labeit et al., 1990; Labeit und Kolmerer, 1995).

A-Band-Titin: Ein großer Teil des Titins ist ein integraler Bestandteil von Proteinkomplexen des A-Band-Bereiches. Aufgrund der Bildung stabiler supra-molekularer Komplexe von Titin und dicken Filamenten ist das A-Band-Titin – obwohl es intrinsisch elastisch ist – funktional steif. Die Anzahl der Titinmoleküle je dickem Filament ist allerdings derzeit noch nicht genau bekannt; diskutiert werden meist drei bis sechs Titinstränge.

Das Titin besteht im A-Band aus zwei regelmäßig angeordneten Bausteinen oder Motivfamilien, immunglobulinartigen (Ig-)Domänen und Fibronectin-Typ-III-(FN3) Modulen (Abb. 2; Labeit et al., 1990; 1992). Solche Motivtypen, die jeweils globuläre Domänen mit siebenfacher, antiparalleler β -Faltblattstruktur bilden, sind im zentralen Bereich des A-Bandes nach dem Muster (Ig-FN3-FN3-Ig-FN3-FN3-FN3-Ig-FN3-FN3-FN3-) angeordnet (Labeit et al., 1992). Diese regelmäßige Abfolge elf einzelner Domänen wurde als „super repeat“ bezeichnet, wobei im A-Band-Titin insgesamt elf solcher „super repeats“ vorkommen (Labeit und Kolmerer, 1995). Da die dicken Filamente ebenfalls „repeats“ mit einer 43-nm-Periodizität aufweisen (und zwar am Myosin und C-Protein), ist anzunehmen, daß das A-Band-Titin einen molekularen Bauplan des dicken Filaments enthält: Der periodische Aufbau des A-Band-Titins könnte die präzise Assemblierung der dicken Filamente organisieren. Das A-Band-Titin scheint also ein Stützprotein zu sein und eine wichtige Rolle bei der Ausprägung einer geordneten Sarkomerstruktur einzunehmen.

I-Band-Titin: Der unter physiologischen Bedingungen elastische Titinabschnitt liegt im I-Band des Sarkomers und ist dort dem dünnen Filamentsystem benachbart (Übersicht bei Labeit et al., 1997). Das Titin ist im I-Band aus mindestens zwei strukturell unterschiedlichen Elementen zusammengesetzt (Abb. 2). Eine dieser Motivfamilien enthält tandemartig angeordnete, wiederholte Abfolgen globulärer Ig-Domänen.



Ein zweites Strukturmotivtyp besteht aus einer als PEVK-Segment bezeichneten, nichtrepetitiven Sequenz mit einem hohen Gehalt an den Aminosäureresten Prolin (P), Glutamat (E), Valin (V) und Lysin (K), für die bisher noch keine bevorzugte strukturelle Faltung nachgewiesen werden konnte (Labeit und Kolmerer, 1995). Außerdem kommen im mittleren Bereich des I-Band-Titins (N2-Region) weitere nichtrepetitive Sequenzen vor, die im kardialen Titin eine beträchtliche Länge annehmen können (Abb. 3). In der Nähe der Z-Scheibe wird das Titin durch Assoziation mit Aktin versteift (Linke et al., 1997), während es im Z-Scheiben-Zentrum an α -Aktinin bindet und dadurch fest an seinem Amino-Terminus verankert ist (Sori-machi et al., 1997).

Differentielle Expression des I-Band-Titins: Die Aufklärung der Primärstruktur der humanen Titine zeigte, daß im quergestreiften Muskel multiple Isoformen mit einem Molekulargewicht von 3000 kDa (kardiales Titin) bis 3700 kDa (Titin des Soleusmuskels) existieren (Labeit und Kolmerer, 1995). Die Expression einer großen Vielfalt an Längenisoformen kommt in erster Linie durch differentielle Spleißvorgänge im I-Band-Titin zustande (Abb.3). Sowohl die Tandem-Ig-Region als auch das PEVK-Element werden in gewebspezifischer Weise differentiell exprimiert, wobei beide Motivfamilien im Herzmuskel generell wesentlich kürzer sind als im Skelettmuskel. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß beim Titin im Gegensatz zu vielen anderen myofibrillären Proteinen keine Genfamilie vorliegt, sondern daß das Titin-Gen beim Menschen von einer einzelnen, auf dem langen Arm des Chromosoms 2 gelegenen Genkopie codiert wird (Labeit et al., 1990). Von diesem „single copy“-Gen entstehen dann durch alternative Spleißvorgänge die verschiedenen Isoformen (Labeit und Kolmerer, 1995).

Titinelastizität

Erste Modelle: Vor Bekanntwerden der Primärstruktur der Herz- und Skelettmuskeltitine gingen erste Konzepte zur Titinelastizität davon aus, daß die Extensionseigenschaften von Ig- und FN3-Domänen, die ~90% der Gesamtmasse

des Titins ausmachen (Labeit und Kolmerer, 1995), die molekulare Grundlage dieser Elastizität darstellen. Allerdings weiß man heute, daß FN3-Domänen im I-Band-Titin nicht vorkommen, so daß sie auch keinen Beitrag zur Titinelastizität leisten können. Da im Gegensatz dazu das I-Band-Titin zahlreiche Tandem-Ig-Module enthält, nahm man an, daß diese Domänen bei Dehnung entfaltet werden können und daß die dafür aufzubringenden Kräfte die passive Spannung des Sarkomers bestimmen. Eine Reihe eleganter *in-vitro*-Studien, die sich neuester technologischer Errungenschaften wie „Laserspizetten“ oder des „Atomic Force Microscope“ bedienen, haben in der Tat zeigen können, daß Entfaltung individueller Titin-Ig-Domänen prinzipiell möglich ist (Rief et al., 1997; Tskhovrebova et al., 1997). Jedoch scheinen die zur Entfaltung notwendigen Dehnungskräfte bei weitem diejenigen zu übersteigen, die unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden. Außerdem ist die Kinetik der Faltung dieser Domänen nicht mit der bekanntermaßen schnellen Retraktion des relaxierten Sarkomers nach moderater Dehnung in Einklang zu bringen. Ig-Domänenentfaltung ist deshalb wohl ein Mechanismus, der für die Elastizität des Titins bei normaler Muskelfunktion bedeutungslos ist (Linke et al., 1996; Labeit et al., 1997). Einen entscheidenden Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Titinelastizität stellte die Entdeckung der PEVK-Region als weiteres Strukturmotiv im I-Band-Titin dar. Die PEVK-Region wurde schon bei ihrer ersten Beschreibung mit den elastischen Eigenschaften des Muskels in Verbindung gebracht, da sie in unterschiedlich steifen Herz- und Skelettmuskeltgeweben in verschiedenen Längenvarianten exprimiert wird (Labeit und Kolmerer, 1995). Da jedoch auch die Tandem-Ig-Region des I-Band-Titins je nach Gewebetyp in unterschiedlichen

Isoformen vorkommt, war es notwendig, den relativen Beitrag beider Struktur-motive zur passiven Spannung experimentell zu bestimmen. Eine solche Identifizierung erfolgte mit Hilfe einer Kombination aus Immunfluoreszenzmikroskopie und Mechanik einzelner Myofibrillen (Linke et al., 1996).

Myofibrillenmechanik: Die einzelne isolierte Myofibrille ist das derzeit wohl beste Modellsystem zum Studium der mechanischen Eigenschaften des Titins im Kontext einer intakten Sarkomerstruktur. Myofibrillen vom Herz- und Skelettmuskel können in einer Apparatur eingespannt werden, mit der gleichzeitig die Kraft und die Länge individueller Sarkomere während der mechanischen Manipulation des Präparats registriert werden (Abb.4). Eine solche Apparatur muß in der Lage sein, die bei Dehnung einer relaxierten Myofibrille (Durchmesser etwa 1 μ m) entstehenden geringen Kräfte von nur wenigen Dutzend nN zuverlässig zu messen. Dementsprechend wurde ein Spannungssensor konstruiert, der Kräfte von etwa 5 nN auflösen kann (Linke et al., 1994; 1996). Mechanische Manipulationen am Präparat erfolgten in einem automatisierten Verfahren mit Hilfe eines piezoelektrischen Mikromotors (Abb.4), der ebenso wie der Kraftsensor durch anwendungsspezifische Software über PC und Datenerfassungskarte angesteuert werden kann. Die Etablierung der Kraftmeßtechnologie an einzelnen Myofibrillen stellte eine wesentliche Voraussetzung zum Studium der elastischen Eigenschaften des Titins dar.

Um die Extensibilität der Ig-Domänenregion und des PEVK-Elements zu analysieren, wurden titinspezifische polyklonale Antikörper gewonnen, die an den Grenzen zwischen diesen beiden Motivfamilien kartieren (Abb.5). Die Positionen der entsprechenden Antikörper-Epitope im Sarkomer – sowie dieje-



nigen einiger weiterer epitopkartierter I-Band-Titinantikörper – wurden dann mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bei Dehnung oder Entspannung einzelner Myofibrillen sichtbar gemacht (Abb.4), während zusätzlich die Ruhedehnungskurven der Myofibrillen aufgenommen wurden. Durch Analyse der Translationsbewegungen der Epitope bei Myofibrillenextension konnte nun festgestellt werden, bei welchen Sarkomerlängen und Spannungen sich welche Titinregionen ausdehnen (Linke et al., 1996).

Zwei-Stufen-Modell der Titinextension:

Für den Skelettmuskel konnte gezeigt werden, daß sich die strukturell unterschiedenen Regionen des I-Band-Titins bei Extension unterschiedlich verhalten (Abb.5). Am Anfang der Sarkomerdehnung nehmen die Tandem-Ig-Regionen zunächst beträchtlich an Länge zu. Bemerkenswert ist, daß bei diesem Längenzuwachs der Ig-Domänen-Regionen aber noch keine nennenswerte passive Spannung entwickelt wird (Einsatzbild in Abb. 5). Ein signifikanter Anstieg dieser Spannung setzt erst bei denjenigen Sarkomerlängen ein, bei denen eine deutliche Extension der PEVK-Domäne beobachtet wird, die Tandem-Ig-Region sich aber nur noch geringfügig verlängert. Bei weiterer Sarkomerlängenzunahme und dem damit verbundenen exponentiellen Spannungsanstieg scheint es zur vollständigen Extension der PEVK-Region zu kommen, während die Ig-Region im allgemeinen erst bei Sarkomerlängen kurz unterhalb des „Belastungslimits“ nochmals stärker an Länge zunimmt, möglicherweise aufgrund von Entfaltung einzelner Domänen. Anhand der Ergebnisse unabhängiger elektronenmikroskopischer Studien sind ähnliche Modelle zur Elastizität des Skelettmuskeltitins in jüngster Zeit entwickelt worden; sie bestätigen weitgehend das hier vorgestellte Konzept der differentiellen Extension des I-Band-Titins. Von besonderem Interesse wird es zukünftig sein, nach der nun erfolgten Beschreibung der elastischen Eigenschaften der PEVK-Region des Titins die Natur dieser Elastizität zu bestimmen.

Eine derzeit favorisierte Möglichkeit besteht darin, daß die bei geringer Dehnung des Moleküls auftretenden Kräfte entropischer Natur sein könnten. Bei

kürzeren Sarkomerlängen würde sich die Titin-Polypeptidkette im Zustand eines „random coil“ befinden und daher bestrebt sein, einen energetisch möglichst günstigen Zustand durch thermische Fluktuation einzunehmen. Zur Extension des Moleküls wäre eine externe Kraft notwendig, die diesen thermischen Kräften Widerstand leistet. Sowohl das PEVK-Element als auch die Ig-Domänenregion vor Entfaltung einzelner Module könnten solche „entropischen Federn“ darstellen. Die zur Extension dieser Federn aufzubringenden Kräfte würden anfangs im Bereich weniger pN liegen (Rief et al., 1997) und erst bei Dehnung auf mehr als 80% der maximalen Länge der Federn höhere Werte annehmen (etwa 5-20 pN). Ob dieses Konzept der „entropischen Feder“ richtig ist, werden zukünftige Experimente, beispielsweise zur Temperaturabhängigkeit der Titinelastizität, zeigen müssen. Zum heutigen Zeitpunkt kann aber bereits gesagt werden, daß wahrscheinlich mit der vollständigen Ausdehnung dieser „entropischen Federn“ der physiologische Sarkomerlängenbereich endet, denn zur maximalen Verlängerung der PEVK-Region eines Titinstranges einer Skelettmuskelfibrille bei Sarkomerlängen kurz unterhalb des Belastungslimits scheinen Kräfte von höchstens 10-20 pN notwendig zu sein (Linke et al., 1996).

Herzmuskel: Im Titin des Myokards ist die PEVK-Region generell viel kürzer als im Skelettmuskel (Abb.3), so daß sie auch nur wenig zum Längengewinn bei Sarkomerdehnung beitragen kann. Deshalb könnte nach dem Ausschöpfen der PEVK-Segment-Extensibilität der Längenzuwachs durch die Entfaltung einzelner Ig-Module bestimmt sein. Da eine solche Entfaltung bei Applikation hoher Kräfte gezeigt wurde (Rief et al., 1997), scheint dieses Konzept plausibel zu sein. Allerdings ist es bei Berücksichtigung des begrenzten physiologischen Sarkomerlängenbereichs im Herzmuskel (1,7-2,3 μm) eher wahrscheinlich, daß Ig-Domänen-Entfaltung *in vivo* nur unter pathophysiologischen Bedingun-

gen relevant ist (Linke et al., 1996). Zumindest ist klar, daß die extreme Kürze der PEVK-Domäne im kardialen Titin zu einer hohen Steifheit der Herzmuskelfibrillen führt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Tandem-Ig-Region und das PEVK-Element wie zwei in Serie geschaltete Komponenten einer inhomogenen molekularen Feder funktionieren. Die Ig-Segmente scheinen für den Längengewinn bei geringer Extension des Sarkomers verantwortlich zu sein, während zumindest im Skelettmuskel der bei stärkeren Dehnungen einsetzende passive Spannungsanstieg mit der Extension der PEVK-Domäne korreliert ist. Das PEVK-Element stellt also die entscheidende Komponente für die passive Kraftentwicklung und den hauptsächlich Längenzuwachs bei Sarkomerdehnung dar. Dies impliziert, daß die spezifische Steifheit eines relaxierten Muskels in erster Linie durch die Länge der PEVK-Region bestimmt wird.

Pathophysiologische Aspekte und Ausblick

Das allgemeine Verständnis von der Funktion der Titinfilamente ist mit der Aufklärung der Primärstruktur des Titins (Labeit und Kolmerer, 1995) entscheidend verbessert worden. Vor diesem Hintergrund wird es zunehmend von Interesse sein, eine mögliche Beteiligung der Titinfilamente bei pathophysiologischen Erscheinungen zu analysieren. Hinweise auf eine Rolle des Titins beim Zustandekommen bestimmter muskulärer Dystrophien existieren bereits (Übersicht bei Labeit et al., 1997). Eine wesentliche Rolle könnten den Titinfilamenten auch bei Störungen der Myokardfunktion zukommen. So wird vermutet, daß Veränderungen in der Expression des Titins bei der Dysfunktion terminal insuffizienter Herzen wichtig sein könnten. Möglich ist, daß es bei pathologischen Prozessen zu einer Veränderung der Titinspleißmuster, etwa im Rahmen einer Anpassung an veränderte mechanische Rahmenbedingungen, kommen könnte. Allerdings ist



bisher noch nicht zufriedenstellend gezeigt worden, daß Veränderungen der molekularen Titinstruktur auch mit Störungen der mechanischen Titinfunktion einhergehen. Eine Beantwortung dieser Frage sollte wesentlich zum Verständnis der Zytoskelett-Beteiligung bei pathologischen Veränderungen des Myokards beitragen.

Vollkommen unverstanden ist derzeit noch, welche Mechanismen die Assemblierung, den Abbau und den „turn-over“ des Titins steuern. Möglicherweise könnten (De)phosphorylierungsprozesse für die Assemblierung dieses Riesenproteins wesentlich sein, da im Titinmolekül Phosphorylierungsstellen in der Z-Scheibe und in der M-Linie und eine Serin-Threonin-Kinasedomäne existieren (Abb.2; Labeit und Kolmerer, 1995). Jedoch konnten bisher weder Hinweise auf die Funktion der Kinasedomäne, noch funktionale Auswirkungen einer Titinphosphorylierung im Z-Scheiben- und M-Linienbereich gefunden werden.

Obwohl das heutige Verständnis von der molekularen Basis der Titinelastizität in jüngster Zeit vor allem dank interdisziplinärer Zusammenarbeit von Physiologen, Biophysikern und Molekularbiologen weiterentwickelt worden ist, ergibt sich noch eine Vielzahl ungelöster Fragen hierzu. So ist unbekannt, warum distinkte I-Band-Isoformen auch innerhalb ein und desselben Gewebes gefunden werden; allein im linken Ventrikel des Kaninchens sind bereits drei Spleißvarianten für die Tandem-Ig-Domänenregion identifiziert worden, während beispielsweise im Psoasmuskel multiple Isoformen des PEVK-Segments exprimiert werden (Abb.3). Könnte dies ein Hinweis auf ein „fine tuning“ der Elastizität in Abhängigkeit von der Substruktur eines Gewebes sein? Oder könnte die Expression einer bestimmten Titinisoform mit dem Vorhandensein eines bestimmten Fasertyps – z.B. den schnellen Fasern vom Typ IIa, IIb etc. – korreliert sein? Abschließend sei gesagt, daß es natürlich vor allem von Interesse sein wird, die Funktion der „molekularen Federn“ im Muskel vollständig aufzuklären. Mit modernen Ansätzen der molekularen Physiologie, und aufbauend auf dem Wissen aus 20 Jahren Titinforschung, sollte dies in naher Zukunft möglich sein.

Literatur

- Fürst, D.O., M. Osborn, R. Nave und K. Weber (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z-line extends close to the M-line. *J. Cell Biol.* 106: 1563-1572.
- Labeit, S., D. Barlow, M. Gautel, T. Gibson, J. Holt, C.-L. Hsieh, U. Francke, K. Leonard, J. Wardale, A. Whiting und J. Trinick (1990). A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature* 345:273-276.
- Labeit, S., M. Gautel, A. Lakey und J. Trinick (1992). Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.* 11:1711-1716.
- Labeit, S. und B. Kolmerer (1995). Titins, giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270:293-296.
- Labeit, S., B. Kolmerer und W.A. Linke (1997). The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* 80:290-294.
- Linke, W.A., V.I. Popov und G.H. Pollack (1994). Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys. J.* 67:782-792.
- Linke, W.A., M. Ivemeyer, N. Olivieri, B. Kolmerer, J.C. Rüegg und S. Labeit (1996). Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J. Mol. Biol.* 261:62-71.
- Linke, W.A., M. Ivemeyer, S. Labeit, H. Hinssen, J.C. Rüegg und M. Gautel (1997). Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: Probing a physiological role. *Biophys. J.* 73:905-919.
- Maruyama, K., S. Matsubara, R. Natori, Y. Nonomura, S. Kimura, K. Ohashi, F. Murakami, S. Handa und G. Eguchi (1977). Connectin, an elastic protein of muscle: characterization and function. *J. Biochem. (Tokyo)* 82:317-337.
- Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez und H.E. Gaub (1997). Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276:1109-1112.
- Rüegg, J.C. (1992). *Calcium in muscle contraction. Second edition.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Sorimachi, H., A. Freiburg, B. Kolmerer, S. Ishiura, G. Stier, C.C. Gregorio, D. Labeit, W.A. Linke, K. Suzuki und S. Labeit (1997). Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z disc titin. Implications for the nature of vertebrate Z discs. *J. Mol. Biol.* 270:688-695.
- Tskhovrebova, L., J. Trinick, J.A. Sleep und R.M. Simmons (1997). Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature* 387:308-312.
- Wang, K., J. McClure und A. Tu (1979). Titin: major myofibrillar component of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3698-3702.

Wolfgang A. Linke, Siegfried Labeit und J. Caspar Rüegg

Korrespondenz:

Dr. W.A. Linke, Physiologisches Institut der Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 326, 69120 Heidelberg.



Aus der Forschung

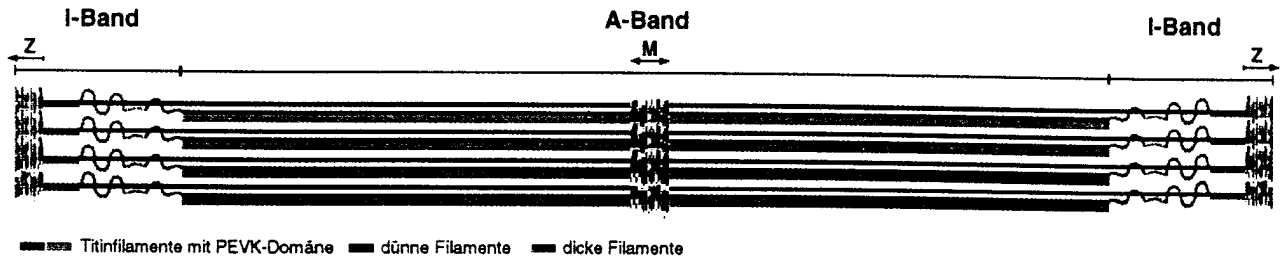


Abbildung 1: Drei-Filament-Modell des Sarkomers. Neben den dünnen und dicken Filamenten existiert in Herz- und Skelettmuskelmyofibrillen ein drittes Filamentsystem, das aus riesigen Proteinsträngen, den Titinen, besteht. Der überwiegende Teil des Titinmoleküls ist an andere Sarkomerproteine gebunden und daher inextensibel. Nur ein Bereich des I-Band-Titins ist funktional elastisch und für die Entstehung der passiven Spannung bei Dehnung relaxierter Muskeln entscheidend. Z, M: Z- und M-Linie.

Aus der Forschung

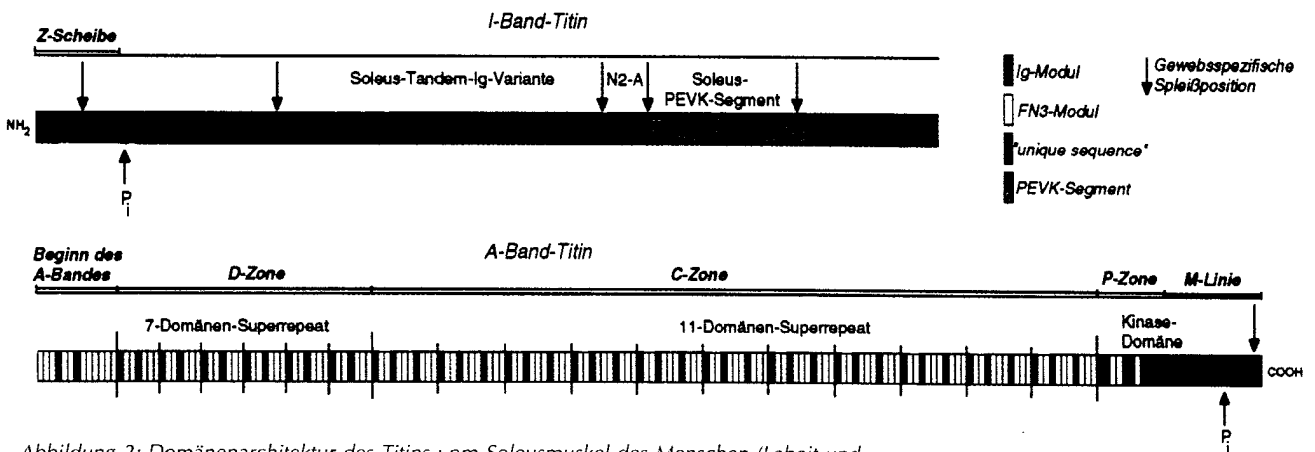
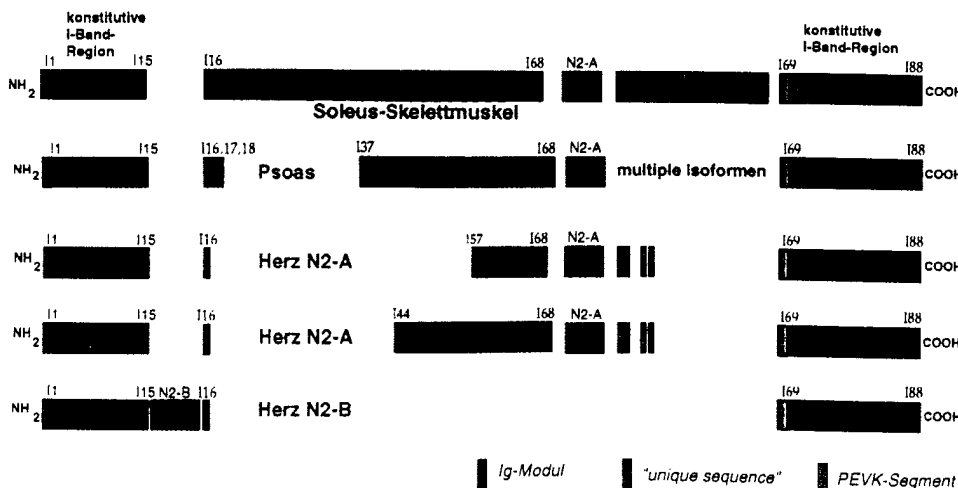
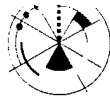


Abbildung 2: Domänenarchitektur des Titins vom Soleusmuskel des Menschen (Labeit und Kolmerer, 1995). Das 3,7 MDa große Polypeptid enthält 297 Kopien von ~100 Aminosäurereste langen Modulen, die zur Superfamilie der Immunglobuline (Ig) bzw. Fibronektine (FN3) gehören und als 10-12 kDa schwere globuläre Untereinheiten vorliegen. Spezifisch für das I-Band-Titin ist eine zu 70% aus nur vier Aminosäuren bestehende Sequenz mit bisher unbekannter Sekundärstruktur, das PEVK-Segment. Außerdem kommen im Titin weitere „unique sequences“ vor, die etwa 8-10% der Masse des Moleküls ausmachen und Phosphorylierungsmotive (Pi) bzw. eine Serin/Threonin-Kinasedomäne codieren.



Aus der Forschung

Abbildung 3: I-Band-Titinisoformen in verschiedenen Muskeltypen der Säuger (unveröffentlichte Ergebnisse am Kaninchen; Labeit et al.). Differenzielles „splicing“ von I-Band-Titin führt zur gewebe-spezifischen Expression diverser Längenvarianten des Moleküls. Beispielsweise werden in der kürzesten Isoform des humanen Myokards 37 Ig-Module exprimiert, während es in Skelettmuskeln 52-90 Module sind (Labeit und Kolmerer, 1995). Auch die PEVK-Region kommt in unterschiedlichen Längen vor.



Aus der Forschung

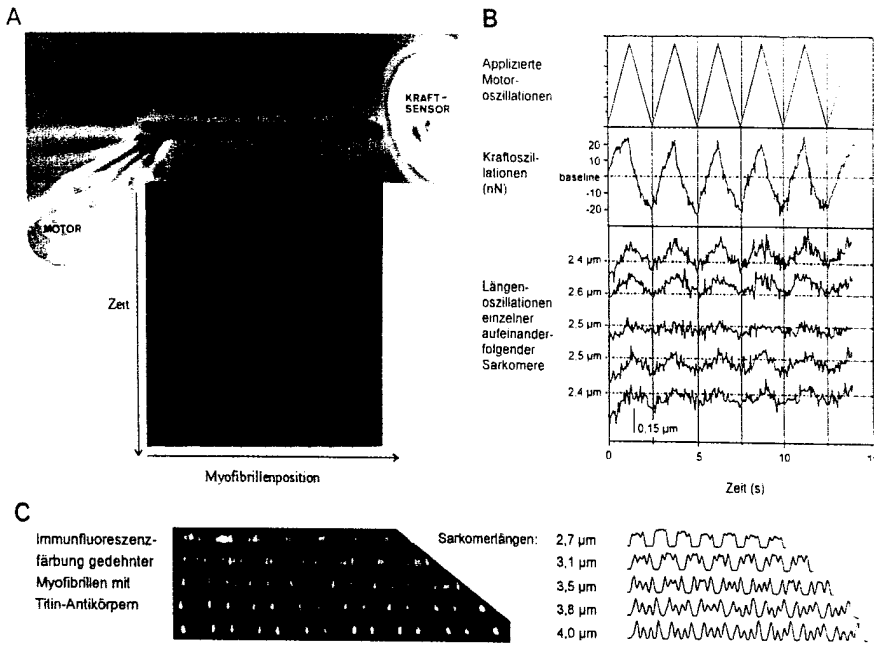


Abbildung 4: Mechanik und Immunfluoreszenzmikroskopie an einzelnen Myofibrillen. (A) Ein Präparat wird zwischen zwei Glasnadelspitzen aufgespannt, die zwecks Messung der Ruhedehnungskurve an einen Mikromotor bzw. Kraftsensor gekoppelt sind. Myofibrillenbilder können digital gespeichert werden. Der untere Teil von (A) zeigt ein in Zeitabständen von 60 ms digitalisiertes Bild, an dem die Länge einzelner Sarkomere während repetitiver Dehnung und Entspannung verfolgt wurde. Aus den Helligkeitsintensitätsprofilen wurde der Abstand benachbarter A-Banden als Sarkomerlänge berechnet (rote Wellenlinien). Hieraus ergeben sich Sarkomerlänge und Kraft (B). Bei Dehnung einer Myofibrille konnten auch die Extensionseigenschaften des Titins analysiert werden (C). Im gezeigten Beispiel wurde ein Präparat mit fluorophormarkierten I-Band-Titinantikörpern angefärbt, die Translationsbewegung der Epitope (je zwei pro Halbsarkomer) sichtbar gemacht (links) und anhand der Intensitätsprofile (rechts) gemessen.

Aus der Forschung

Abbildung 5: Modell zur Titinelastizität im Psoasmuskel. Gezeigt ist vor allem der I-Band-Abschnitt eines Halbsarkomers bei verschiedenen Dehnungszuständen. Im Diagramm oben rechts ist die typische Ruhedehnungskurve einer Psoasmyofibrille dargestellt, die Buchstaben A bis D beziehen sich auf die entsprechenden Sarkomerlängen in der Hauptabbildung. Zu beachten ist die sequentielle Extension von Ig-Domänensegmenten (rote Perlen) und PEVK-Region; erst bei Ausdehnung der letzteren entsteht eine signifikante passive Spannung. Der Zustand in (D) wird unter physiologischen Bedingungen wohl nicht erreicht. T12, N2-A, I20I22, MIR: Epitopositionen von Titanantikörpern (nach Linke et al., 1996).

