

## Muskelsarkomere

# Titin – ein strukturbiologisches Puzzle von gigantischem Ausmaß

MATTHIAS WILMANN

EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE, AUSSENSTELLE HAMBURG

**Titin ist ein riesiges Filamentprotein und wird sowohl in den Sarkomereinheiten von Skelettmuskeln und als auch Herzmuskeln gefunden. Es erstreckt sich über die Hälfte einer Sarkomereinheit von mehr als 1 µm Länge, von der peripheren Z-Scheibe bis zur zentralen M-Bande. Titin bildet zusammen mit anderen großen Filamentsystemen (u. a. Aktin, Myosin, Nebulin, Obscurin) den molekularen Apparat, der für die grundlegende Funktion von Muskelzellen zuständig ist, Kontraktion und Relaxation.**

### Titin – das größte Protein des menschlichen Genoms

Der Beitrag von Titin in dieser Sarkomearchitektur ist die eines „molekularen Lineals“<sup>[1, 2]</sup>. Weil es mit vielen anderen Sarkomerkomponenten, deren Distanzen sich während des Kontraktion/Relaxation-Zyklus laufend ändern, in direktem Kontakt steht, muss es molekulare elastische Eigenschaften besitzen.

Da Titin in einer Vielzahl von Muskelzellen gefunden wird, ist es nicht verwunderlich, dass eine Reihe unterschiedlichster Isoformen mit Molekulargewichten bis 4,2 MDa identifiziert wurden, die insbesondere im flexiblen I-Bandenbereich stark variieren. Die

komplette Sequenz von menschlichem Titin besitzt 38.138 Aminosäuren, die in 363 Exons organisiert sind und für die über 300 gefaltete Domänen vorhergesagt wurden<sup>[3, 4]</sup> (**Abb. 1**). Die Mehrheit dieser Einheiten sind entweder als Immunglobulin(Ig)-Domänen oder Fibronectin-Typ-III-(Fn-III)-Domänen gefaltet, sodass eine stark repetitive Domänentopologie entsteht. Im Bereich der I-Bande befinden sich aber auch lange Regionen von PEVK-Sequenzmotiven. Diese Regionen sind vermutlich weitgehend ungefaltet und werden deshalb mit den elastischen Eigenschaften von Titin in Verbindung gebracht<sup>[5-7]</sup>. Auffallend in der Gesamtsequenz ist die Präsenz einer Proteinkinase, die eine wichtige Ver-

bindung dieses Strukturproteins mit dynamischen Signaltransduktionswegen herstellt.

Angemerkt sei, dass ein großer Teil der Gesamtsequenz von Titin bereits zu Anfang der 1990er Jahre, d. h. vor Beginn systematischer Sequenzierungen vollständiger Genome, bestimmt wurde<sup>[3]</sup>. Die Kenntnis der Sequenz von Titin wurde zur Grundlage von strukturbiologischen Arbeiten. Die rasante Wissenschaftsgeschichte von Titin mit über 1.100 Zitaten in PubMed (Stand: September 2007) ist bemerkenswert angesichts der Tatsache, dass dieses Protein erst vor weniger als 30 Jahren identifiziert wurde<sup>[8]</sup>. Aufgrund seiner enormen Größe kann Titin mit lichtmikroskopischen Methoden sichtbar gemacht werden<sup>[9]</sup>. Die gefundenen fadenförmigen Ultrastrukturen machen allerdings klar, dass es derzeit keine Methoden gibt, eine wünschenswerte hoch aufgelöste 3-D-Struktur des gesamten Moleküls zu bestimmen.

### Titin – ein strukturgenomisches Projekt

Im Jahr 1998 wurde mit dem ersten großen Strukturgenomikprojekt, der Proteinstrukturfabrik in Berlin, in Deutschland begonnen. Dieses und weitere Projekte waren ein Versuch, etablierte Hochdurchsatzmethoden aus dem Bereich der Genomsequenzierung und komplementäre Funktionsgenomikmethoden auf den Bereich der experimentellen Strukturbiologie zu übertragen. Eine Dekade strukturbiologischer Forschung an Titin ermöglicht es, Bilanz zu ziehen und zukünftige Trends zu erkennen.

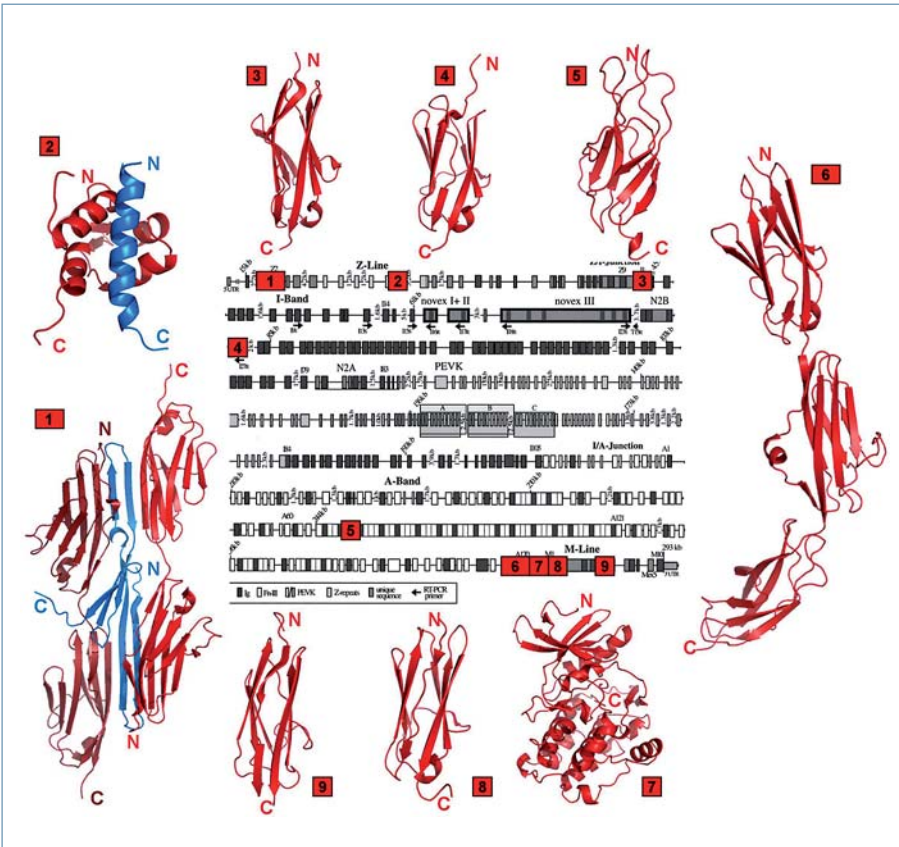
In der Protein Data Bank sind derzeit 18 Strukturen von Titinsequenzen deponiert (**Tab. 1**). Die Strukturen wurden entweder mit kristallografischen Methoden oder NMR-Spektroskopie gelöst.

### Titin Ig- und Fn-III-Domänen: Modelle für elastisches Verhalten von Proteinfilamenten

Die meisten Strukturen bestehen entweder aus einzelnen Ig- (I1, I27, M1, M5) oder Fn-III- (A71)-Domänen. Bemerkenswert ist, dass

PDB-Eintrag	Methode	Bezeichnung	Ligand	Weitere PDB-Einträge
1ZA5	X-Ray	Z1-Z2	Telethonin	2A38, 2F8V
1H8B	NMR	Zr7	α-Aktinin	
1G1C	X-Ray	I1		
1WAA	X-Ray	I27		1TIT, 1TIU
1BPV	NMR	A71		
2NZI	X-Ray	A168-A170		2J8H, Jj8O
1TKI	X-Ray	Kinase		
2BK8	X-Ray	M1		
2NCU	NMR	M5		1NCT, 1TNM, 1TNN

Tab. 1: Nicht-redundante 3-D-Strukturen von Titin-Fragmenten.



▲ **Abb. 1:** Nicht-redundante 3-D-Strukturen von Titin-Domänen (vgl. Tab. 1). Titin (rot, weinrot), Liganden (blau). Die Termini aller Sequenzen sind bezeichnet. Die ungefähren Positionen der Domänen mit bekannten 3-D-Strukturen sind in der schematischen Darstellung der Domänentopologie (mit freundlicher Genehmigung aus [4] entnommen) der gesamten Titinsequenz gekennzeichnet.

allen diesen Strukturen eine bipolare Anordnung der jeweiligen Termini gemeinsam ist, die ein Auseinanderziehen von Domänen unter externen Kräften vorstellbar macht (**Abb. 1**). Insbesondere die NMR-Struktur der I27-Domäne diente als Grundlage für Untersuchungen, um die Stabilität der Faltung dieser Ig-Domäne unter externen mechanischen Kraftbedingungen zu untersuchen<sup>[10-13]</sup>. Eine kürzlich in unserem Labor gelöste Kristallstruktur der gleichen Domäne (PDB Code: 1WAA; Vega & Wilmanns, unpubliziert) zeigt allerdings deutliche Unterschiede zur bereits länger zugänglichen NMR-Struktur<sup>[14]</sup>. Weil die Ausgangskordinaten kritisch für den Verlauf von Simulationen sind, werden möglicherweise Reinterpretationen der Folgen von externen Krafteinwirkungen für diese Domäne notwendig sein. Es sei auch darauf hingewiesen, dass mögliche Domänenentfaltungen unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich sind<sup>[15, 16]</sup>.

Zusätzliche Informationen über die Rolle von Domänen-verbindenden Schleifen unter

externen Kräften ergeben sich aus neueren Strukturen von multiplen Domänen-Konstrukten. Während die Anordnung der beiden N-terminalen Ig-Domänen Z1-Z2 in Abwesenheit von Liganden flexibel ist<sup>[17]</sup>, deuten neuere Arbeiten darauf hin, dass die Anordnungen von benachbarten Ig-Domänen und Fn-III-Domänen in der A-Bande (A168-A169-A170) rigide sind<sup>[18, 19]</sup>. In Gegenwart von Telethonin, das spezifisch an den N-Terminus von Titin bindet, bildet sich ebenfalls eine rigide Struktur des N-terminalen Ig-Tandems Z1-Z2<sup>[20]</sup>. Interessanterweise bildet sich in Gegenwart dieses Liganden ein Titin-Telethonin-Titin-Sandwich-Komplex, der Rückschlüsse auf die N-terminale Assemblierung von Titin und Verankerung in der sarkomeren Z-Scheibe erlaubt.

**Verknüpfung von Titin zu  $\alpha$ -Aktininbrücken**

Die einzige weitere Struktur eines Titin-Liganden-Komplexes stammt von einer Z-Repeat-Domäne aus dem N-terminalen Bereich von

Titin in Gegenwart einer Helix aus der Titin-bindenden Kopf-Domäne von  $\alpha$ -Aktinin<sup>[21]</sup>. Basierend auf biochemischen Daten und Ultrastrukturdaten wurde zuvor ein Modell für die Verbrückung des N-terminalen Bereichs von Titin mit Aktin vorgeschlagen, die maximal jede zweite Z-Repeat-Domäne in eine  $\alpha$ -Aktinin-Brücke involviert<sup>[22]</sup>. Dieses Modell ließ allerdings offen, mit welchen Funktionen die verbliebenen Z-Repeat-Domänen assoziiert sein könnten. Die Struktur des Z-Repeat/Aktinin-Komplexes erlaubte zumindest eine verbesserte Abschätzung der erforderlichen Dimensionen für die Brückenbildung von  $\alpha$ -Aktinin-Filamenten.

**Die Rolle von Titin in katalytischen Signaltransduktionsprozessen**

Biochemische und klinische Studien in Bezug auf die einzige katalytische Domäne in Titin, einer Serin/Threonin-Kinase in der A-Bande nahe des C-Terminus, deuten auf eine Beteiligung dieser Kinase sowohl in der Myofibrillogenese als auch in ausgereiften Muskelsarkomeren hin<sup>[23, 24]</sup>. Auf molekularer Ebene wurden zwei Substrate bzw. Liganden identifiziert, die Verbindungen zu Assemblierungsprozessen in der Z-Scheibe (Telethonin) und zur Regulation spezifischer Muskelgene im Zellkern herstellen<sup>[25, 26]</sup>. Die Strukturbestimmung dieser Kinase durch unser Labor entschlüsselte zwei mögliche Regulationsmechanismen, Phosphorylierung einer spezifischen Aminosäure nahe des aktiven Zentrums (Tyr170) und Regulation durch Kalzium/Calmodulin<sup>[26]</sup>. In der Struktur blockiert die C-terminale autoregulatorische Domäne, die Kalzium/Calmodulin-regulierten Proteinkinasen gemeinsam ist, das aktive Zentrum. Allerdings war es bis jetzt nicht möglich, einen stabilen Kinase/Calmodulin-Komplex nachzuweisen (Zou & Wilmanns, unpubliziert) und es ist nach wie vor nicht bekannt, ob diese Form der Regulation tatsächlich unter physiologischen Bedingungen stattfindet. In einer Computer-gestützten Simulation wurde kürzlich interessanterweise die Möglichkeit einer durch äußere Kräfte induzierten Regulation vorgeschlagen<sup>[27]</sup>. In dieser Studie wurde ein kleines  $\beta$ -Sheet nahe des aktiven Zentrums, das den C-Terminus der autoregulatorischen Domäne verankert, als potenzieller Schwachpunkt ausgemacht. Falls solch eine Form der Regulation stattfinden sollte, würde man vermuten, dass die Einwirkung externer Kräfte zu einer Aktivierung dieser Kinase führt. Dies würde implizieren, dass für diesen Regulationsprozess

eine intakte Umgebung Voraussetzung wäre, die den Aufbau externer Kräfte erlaubt, d. h. funktionelle Muskelsarkomere.

## Ausblick

In Anbetracht von über 300 gefalteten Domänen ist die Zahl bekannter 3-D-Strukturen von Titinfragmenten noch klein (**Abb. 1**). Aufgrund der hoch-repetitiven Domänenstruktur ist es aber möglich, insbesondere Ig-Domänen ohne bekannte 3-D-Struktur zu modellieren<sup>[28, 29]</sup>. Bereiche der Titinsequenz zum Beispiel aus der I-Bande, die als ungefaltet vorhergesagt werden, erfordern alternative Methoden, um indirekt Informationen über ihre Strukturen zu bekommen<sup>[11]</sup>.

Ziel zukünftiger strukturbiochemischer Untersuchungen muss es sein, strukturelle Erkenntnisse über größere molekulare Zusammenhänge zu bekommen, die über die Bestimmung von Domänenfaltungen hinausgehen. Ein zentrales Anliegen wird sein, Titinfragmente zu identifizieren, die ausreichend rigide sind, um erfolgreiche Kristallisation zu ermöglichen. Das Beispiel der Struktur des N-terminalen Titin/Telethonin-Komplexes zeigte zum Beispiel, dass es Sarkomere Proteine gibt, in diesem Fall Telethonin, deren Faltung nur in Gegenwart von Liganden (Titin) induziert wird und somit eine Strukturbestimmung ermöglicht<sup>[20]</sup>. Darüber hinaus kann man erwarten, dass die molekulare Bestimmung der unterschiedlichen und dynamischen Interaktome im Sarkomer von steigender Bedeutung sein wird<sup>[11]</sup>. Für die Strukturbiologie ergibt sich daraus, dass die Bestimmung binärer und multimerer Komplexe, in die Titin involviert ist, ein zentrales Ziel zukünftiger Untersuchungen definieren wird. Dafür wird es essenziell sein, komplementäre Methoden weiterzuentwickeln, die eine genauere Positionierung der jeweiligen 3-D-Strukturen erlauben werden. Aufgrund der enormen Größe von Titin sind bedauerlicherweise gezielte Knock-out/Knock-in-Methoden, die eine Überprüfung strukturbasierender Erkenntnisse unter physiologischen Bedingungen möglich machen könnten, derzeit noch nicht einsetzbar.

## Danksagung

Die in unserem Labor durchgeführten Arbeiten wurden durch wichtige Beiträge von Prof. Olga Mayans, Dr. Simone Müller, Dr. Nikos Pinotsis und Dr. Peijian Zou möglich. Bei Prof. Mathias Gautel möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit über mehr als eine Dekade bedanken. Ein Teil der vorge-

stellten Arbeiten wurde durch Förderungen seitens der EU (CAMKIN; HPRN-CT-2002-00252) möglich.

## Literatur

- [1] Lange, S., Ehler, E., Gautel, M. (2006): From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 16: 11–18.
- [2] Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2003): Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 679–689.
- [3] Labeit, S., Kolmerer, B. (1995): Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270: 293–296.
- [4] Bang, M. L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A. J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C. C., Labeit, D., Gregorio, C. C., Granzier, H., Labeit, S. (2001): The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ. Res.* 89: 1065–1072.
- [5] Li, H., Oberhauser, A. F., Redick, S. D., Carrion-Vazquez, M., Erickson, H. P., Fernandez, J. M. (2001): Multiple conformations of PEVK proteins detected by single-molecule techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10682–10686.
- [6] Duan, Y., DeKeyser, J. G., Damodaran, S., Greaser, M. L. (2006): Studies on titin PEVK peptides and their interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 454: 16–25.
- [7] Nagy, A., Grama, L., Huber, T., Bianco, P., Trombitás, K., Granzier, H. L., Kellermayer, M. S. (2005): Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *Biophys. J.* 89: 329–336.
- [8] Wang, K., McClure, J., Tu, A. (1979): Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3698–3702.
- [9] Wang, K., Williamson, C. L. (1980): Identification of an N2 line protein of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3254–3258.
- [10] Li, H., Oberhauser, A. F., Fowler, S. B., Clarke, J., Fernandez, J. M. (2000): Atomic force microscopy reveals the mechanical design of a modular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6527–6531.
- [11] Li, H., Linke, W. A., Oberhauser, A. F., Carrion-Vazquez, M., Kerkvliet, J. G., Lu, H., Marszalek, P. E., Fernandez, J. M. (2002): Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* 418: 998–1002.
- [12] Geierhaas, C. D., Best, R. B., Paci, E., Vendruscolo, M., Clarke, J. (2006): Structural comparison of the two alternative transition states for folding of TI I27. *Biophys. J.* 91: 263–275.
- [13] Sotomayor, M., Schulten, K. (2007): Single-molecule experiments in vitro and in silico. *Science* 316: 1144–1148.
- [14] Improta, S., Politou, A. S., Pastore, A. (1996): Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure* 4: 323–337.
- [15] Tskhovrebova, L., Houmeida, A., Trinick, J. (2005): Can the passive elasticity of muscle be explained directly from the mechanics of individual titin molecules? *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26: 285–289.
- [16] Williams, P. M., Fowler, S. B., Best, R. B., Toca-Herrera, J. L., Scott, K. A., Steward, A., Clarke, J. (2003): Hidden complexity in the mechanical properties of titin. *Nature* 422: 446–449.
- [17] Marino, M., Zou, P., Svergun, D., Garcia, P., Edlich, C., Simon, B., Wilmanns, M., Muhle-Goll, C., Mayans, O. (2006): The Ig doublet Z122: a model system for the hybrid analysis of conformational dynamics in Ig tandems from titin. *Structure* 14: 1437–1447.
- [18] Mrosek, M., Labeit, D., Witt, S., Heerklotz, H., von Castelmur, E., Labeit, S., Mayans, O. (2007): Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin. *FASEB J.* 21: 1383–1392.
- [19] Müller, S., Lange, S., Gautel, M., Wilmanns, M. (2007): Rigid conformation of an immunoglobulin domain tandem repeat in the A-band of the elastic muscle protein titin. *J. Mol. Biol.* 371: 469–480.
- [20] Zou, P., Pinotsis, N., Lange, S., Song, Y. H., Popov, A., Mavridis, I., Mayans, O. M., Gautel, M., Wilmanns, M. (2006): Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* 439: 229–233.
- [21] Atkinson, R. A., Joseph, C., Kelly, G., Muskett, F. W., Frenkiel, T. A., Nietlispach, D., Pastore, A. (2001): Ca<sup>2+</sup>-independent binding of an EF-hand domain to a novel motif in the alpha-actinin-titin complex. *Nat. Struct. Biol.* 8: 853–857.
- [22] Young, P., Ferguson, C., Bañuelos, S., Gautel, M. (1998): Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *Embo J.* 17: 1614–1624.
- [23] Weinert, S., Bergmann, N., Luo, X., Erdmann, B., Gotthardt, M. (2006): M line-deficient titin causes cardiac lethality through impaired maturation of the sarcomere. *J. Cell Biol.* 173: 559–570.
- [24] Carmignac, V., Salih, M. A., Quijano-Roy, S., Marchand, S., Al Rayess, M. M., Mukhtar, M. M., Urtizberea, J. A., Labeit, S., Guicheney, P., Leturcq, F., Gautel, M., Fardeau, M., Campbell, K. P., Richard, I., Estournet, B., Ferreira, A. (2007): C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann. Neurol.* 61: 340–351.
- [25] Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L. G., Hughes, S. M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edström, L., Ehler, E., Udd, B., Gautel, M. (2005): The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 308: 1599–1603.
- [26] Mayans, O., van der Ven, P. F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Fürst, D. O., Wilmanns, M., Gautel, M. (1998): Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395: 863–869.
- [27] Gräter, F., Shen, J., Jiang, H., Gautel, M., Grubmüller, H. (2005): Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* 88: 790–804.
- [28] Amodeo, P., Fraternali, F., Lesk, A. M., Pastore, A. (2001): Modularity and homology: modelling of the titin type I modules and their interfaces. *J. Mol. Biol.* 311: 283–296.
- [29] Fraternali, F., Pastore, A. (1999): Modularity and homology: modelling of the type II module family from titin. *J. Mol. Biol.* 290: 581–593.

## Korrespondenzadresse:

PD Dr. Matthias Wilmanns  
Leiter EMBL-Hamburg  
EMBL c/o DESY  
Notkestraße 85  
D-22603 Hamburg  
Tel.: 040-89902 110  
Fax: 040-89902 149  
wilmanns@embl-hamburg.de

## AUTOR



### Matthias Wilmanns

1980–1982 Chemiestudium an der TU Karlsruhe (Vordiplom), 1982–1986 Chemiestudium an der Universität Freiburg i. Br., 1986–1990 Promotion in Biochemie an der Universität Basel, 1991–1993 Postdoc an der University California Los Angeles, 1993–1994 Postdoc bei EMBL (Heidelberg), 1995–1996 Stabwissenschaftler bei EMBL (Heidelberg), seit 1997 Leiter der EMBL-Hamburg Einheit, Gruppenleiter und EMBL Senior Scientist, 1997 Habilitation an der Universität Basel.