

Mechanismen der Erkrankung der Skelettmuskulatur

I. V. Röder, J. Roll, Y. Petersen, J. Martin, R. Rudolf, ITG

Neuromuskuläre Erkrankungen und ihre Wirkebenen

Jede Art willkürlicher Bewegung, vom Atmen über das Sprechen, Essen, Gehen bis zum Schreiben dieser Zeilen, wird durch Skelettmuskulatur vermittelt. Dementsprechend schwerwiegend sind krankhafte Veränderungen in diesem System. Das Interesse ist groß, diesen Veränderungen auf die Spur zu kommen und sie wo möglich zu beseitigen. Der Weg dahin ist aufgrund der Komplexität der Zusammenarbeit verschiedener Gewebetypen sehr langwierig. Unsere Willkürmotorik basiert nämlich auf einer Interaktion zwischen zentralem und peripherem Nervensystem und der Skelettmuskulatur selbst. Während in Gehirn und Rückenmark eingehende – sensorische – und ausgehende – motorische – Reize miteinander abgeglichen werden, setzen die sogenannten Motoneurone, welche Rückenmark und Muskeln miteinander verbinden, diese zentralnervösen Signale in muskelstimulierende Erregungsmuster um. Letztere bewirken die Kontraktion der Skelettmuskulatur auf so erstaunlich feine Weise, dass es uns möglich ist, komplizierteste Bewegungsvorgänge durchzuführen. Auf jeder der genannten regulatorischen Ebenen kann es zu Erkrankungen kommen, deren Schweregrad alleine durch exemplarische Nennungen deutlich wird – z. B. Parkinsonsche Krankheit für das Zentralnervensystem, Multiple Sklerose für die Motoneurone und Duchenne Muskeldystrophie für die Skelettmuskulatur.

Muskeldystrophien – Ursachen und Wirkungen

Wir beschäftigen uns mit Mechanismen, die für die Ausbildung der muskelbasierten Erkrankungen wichtig sind. Unter diesen sind besonders die Muskeldystrophien bekannt, eine Gruppe von Syndromen, die alle durch progressiven Muskelschwund und damit einhergehende Einschränkungen der Bewegungsfähigkeit gekennzeichnet sind. In besonders schweren Fällen, wie zum Beispiel der Duchenne Muskeldystrophie, führt die Muskelschwäche bereits im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt zum Tod durch Herzversagen oder Atemstillstand.

Ein Meilenstein in der Dystrophieforschung war die Erkenntnis, dass alle Patienten, die unter der Duchenne-Form leiden, Mutationen im Dystrophin-Gen aufweisen [1]. Dieses Gen ist verantwortlich für die Herstellung von Dystrophin, welches eines der größten menschlichen Proteine darstellt. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass Dystrophin Teil eines umfangreichen Proteinkomplexes ist, der die Muskelzelle mit ihrer Umgebung verzahnt und ihr so zusätzliche Stabilität gegen die hohen Scherkräfte verleiht, die während der Muskelkontraktion auftreten [2]. Man geht deshalb davon aus, dass Fasern, bei denen dieser Proteinkomplex nicht intakt ist, schon bei normaler Beanspruchung Mikrorisse aufweisen, und nachfolgend das zelluläre Gleichgewicht so stark gestört ist, dass die Fasern nach und nach absterben. Als besonders problematisch wird bei diesem Geschehen der Einstrom von Calciumionen angesehen [3]. Während die-

se Ionen einerseits für die ganz normale Regulation der Muskelkontraktion unentbehrlich sind, können sie bei übermäßigem Auftreten auch den Zelltod bewirken, und im Falle der Entstehung der Muskeldystrophien scheint dies ein entscheidender Faktor zu sein. Auf morphologischer Ebene fallen im dystrophischen Muskel neben deutlichen Anzeichen von Entzündung und Verdrängung des Muskelgewebes durch Fett- und Bindegewebe hauptsächlich Veränderungen im Zellskelett und der neuromuskulären Synapse, der Verbindung zwischen Nerv und Muskel, auf.

Die Maus als Modell für die Erforschung der Muskeldystrophien

Aufgrund der genannten Hypothesen zur Krankheitsentstehung und der beobachteten Symptome gehen wir besonders zwei Fragen nach: 1. Inwieweit und an welcher Stelle ist das zelluläre Gleichgewicht gestört, und welche Folgen hat dies für den Muskel? 2. Welche Ursachen liegen der veränderten Morphologie der Synapse zugrunde, und welche Rolle spielt dies für das Überleben der Faser? Diese Vorgänge können in Zellkultursystemen nicht oder nur sehr unbefriedigend bearbeitet werden, da dort die Scherkräfte und Signalmechanismen, die im lebenden Muskel wirksam und entscheidend sind, nicht nachgestellt werden können. Es wurde deshalb nötig, nach geeigneten Systemen zu suchen, die einerseits die molekularen Mechanismen, die den Muskeldystrophien zugrunde liegen, widerspiegeln und die andererseits hinreichend klein wären, um für die notwendige mikroskopi-

sche Analyse verfügbar zu sein. Beide Bedingungen erfüllt die Maus. Bei dieser Spezies existiert eine Reihe von Formen, bei denen dieselben genetischen Defekte auftreten, die auch beim Menschen zur Ausbildung der Muskeldystrophien führen. Ausserdem sind eine Anzahl an oberflächlichen Skelettmuskeln besonders gut experimentell zugänglich und überdies genetisch manipulierbar. Wir machten uns deshalb vor wenigen Jahren daran, Modelle zu entwickeln, die uns einen direkten Einblick die das Zellgleichgewicht im lebenden gesunden und kranken Skelettmuskel gewähren würden.

Technologische Fortschritte ermöglichen neue Einsichten in der biomedizinischen Forschung

Auf dem Weg dahin halfen uns besonders technologische Entwicklungen auf zwei Gebieten, nämlich der Mikroskoptechnologie und der Entwicklung fluoreszierender Proteine als molekulare Sonden. Im Bereich der Mikroskopie wurde seit Anfang der neunziger Jahre durch Winfried Denk (Heidelberg) und Kollegen die sogenannte Zweiphotonenmikroskopie in die biologische Forschung eingeführt. Diese Technologie ermöglicht die nicht-invasive Visualisierung fluoreszierender Objekte tief im Gewebe und hat bereits eine Reihe wichtiger Erkenntnisse über physiologische Vorgänge, z. B. im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems, geliefert. Besonders profitiert hat diese Methode durch die quasi parallele Entdeckung und Entwicklung des sogenannten Grün Fluoreszierenden Protein

(GFP) als genetischer Marker. GFP ist ein Protein aus Quallen, das auch nach Bildung in Fremdorganismen selbsttätig zu einer fluoreszenten Form heranreift. Zunächst wurde GFP in erster Linie als Marker für Proteinbildung und -verteilung eingesetzt. Inzwischen kennt man eine ganze Serie von verschiedenen Formen und Farbvarianten von GFP und anderen fluoreszierenden Proteinen, die zusammen ein wichtiges Werkzeugarsenal für biologische und biochemische Labors darstellen. Gemeinsam ist all diesen Werkzeugen, dass sie mit Hilfe gewöhnlicher genetischer Verfahren in das Untersuchungsobjekt eingeführt werden und dort für die jeweiligen Zwecke eingesetzt werden können.

Basierend auf diesen beiden technologischen Entwicklungen konnten wir schließlich ein experimentelles System entwickeln, das erstmals direkte Einsichten in das zelluläre Gleichgewicht mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung gestattete (siehe Abb. 1). Dazu wurden zunächst die fluoreszenten Proteinsonden in den Muskel übertragen und dann, nach einer Reifungszeit der Sonden mithilfe der Zweiphotonenmikroskopie am betäubten Tier die zu bestimmenden Parameter vermessen. Bevor wir uns aber an die Untersuchung unbekannter physiologischer Phänomene machten, mussten wir sicherstellen, dass unsere Präparate intakt sind, das heißt, dass sie auf Reize mit bekannter Antwort entsprechend reagieren würden. Zunächst untersuchten wir also, ob die Muskeln bei Stimulierung mit zunehmender Stimulationsfrequenz zunehmend kontrahierten

und ob dieser Effekt positiv mit der Konzentration an Calcium-Ionen in den Fasern korrelierte. Für die Messung der Calcium-Ionendynamik benutzten wir eine spezifische Fluoreszenzsonde, die ihr Leuchtverhalten in Abhängigkeit der vorhandenen Calcium-Ionenkonzentration ändert. Erfreulicherweise entsprachen unsere Messergebnisse den Erwartungen und wir konnten eine direkte Beziehung zwischen Stimulationsfrequenz, Muskelkontraktion und Calcium-Ionenspiegel in den Muskelfasern zeigen.

Beschreibung physiologischer Calcium-Puffersysteme

Als Nächstes wendeten wir uns der Fragestellung zu, welche zellulären Kompartimente an der Regulierung des Calcium-Spiegels beteiligt wären. Dies ist von Bedeutung für die Ursachenerforschung der Muskeldystrophien, weil man zwar einerseits davon ausgeht, dass ein verstärktes Auftreten von Calcium-Ionen in der Muskelfaser entscheidend für die Krankheitsauslösung sein könnte, andererseits aber unklar ist, über welchen Mechanismus letztlich die Faserintegrität angegriffen wird. Wie bereits erwähnt, benötigt die Muskelzelle Calcium-Ionen für die Kontraktion, reagiert aber auf einen dauerhaft erhöhten Calcium-Spiegel mit dem Absterben der Faser. Es ist also absolut essenziell, dass die Konzentration dieses Ions in jeder Situation genau eingestellt ist. Dazu bedient sich die Muskelzelle einer Reihe verschiedener Mechanismen, die im wesentlichen auf einer kontrollierten Separierung von Calcium basieren, das

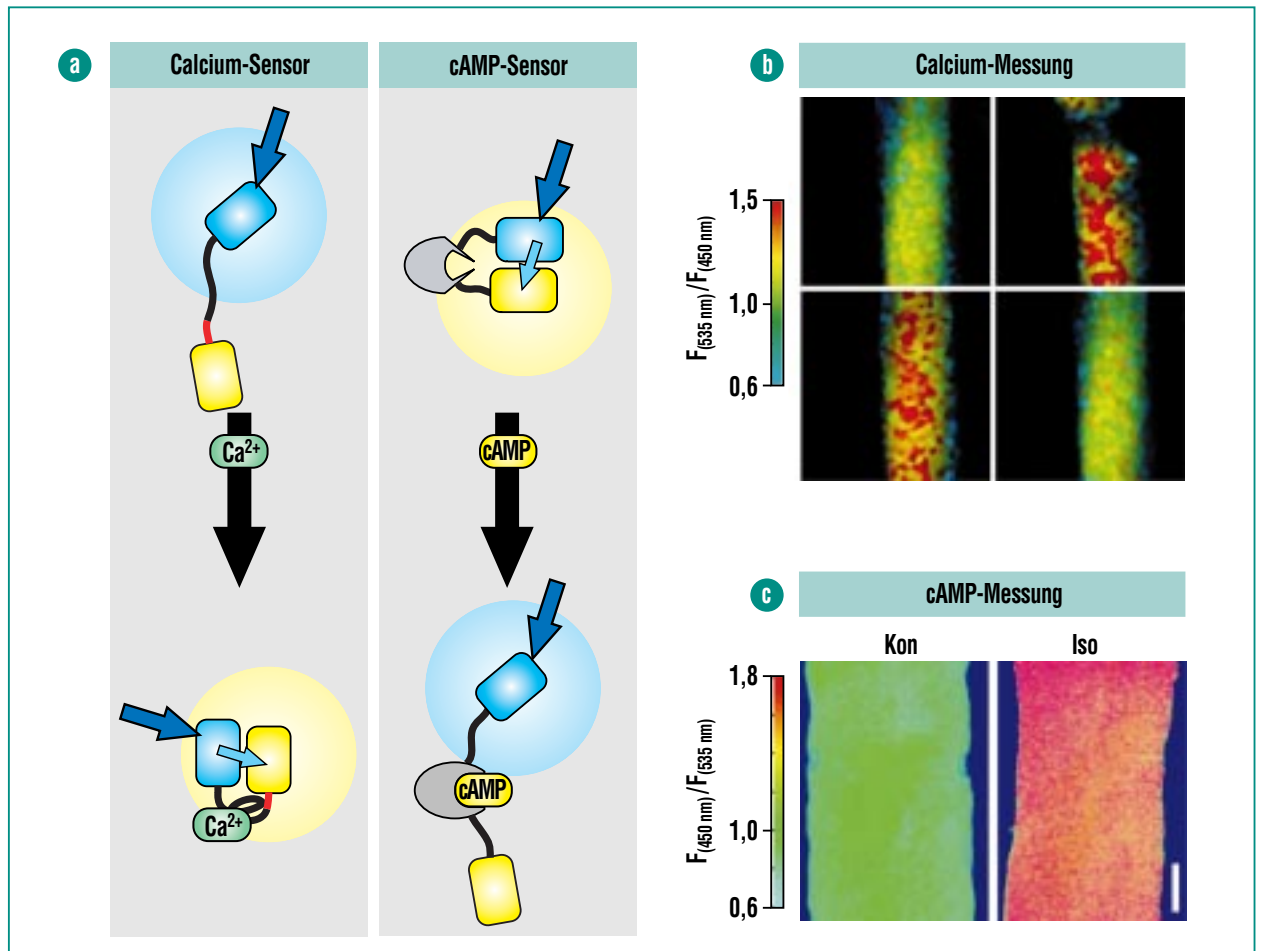


Abb. 1: Molekulare Nanosensoren und deren Anwendung in der Muskelforschung. a): Wirkungsweise von Ca^{2+} - und cAMP-Sensoren. Die Bindung von Calcium-Ionen (links) oder cAMP (rechts) führt durch Molekülumlagerungen zu einer messbaren Veränderung der Fluoreszenzfarbe. Dunkelblaue Pfeile, Anregungslicht; hellblaue/gelbe Kreise, Fluoreszenzfarbe. b) und c): Messung physiologischer Parameter im Muskel mittels Nanosensoren und Zweiphotonenmikroskopie. Erhöhte Calcium- (b) und cAMP-Spiegel (c) aufgrund physiologischer Stimuli sind durch Falschfarbenwechsel von grün nach rot angezeigt.

heißt sie lagert diese Ionen während der Ruhephasen in bestimmten Depots und entlässt es nur zum Zwecke der Kontraktion und in portionierten Mengen aus diesen Depots in das Zellinnere. Zum Beenden der Kontraktion muss das Calcium freilich wieder zurück in die Depots gepumpt werden. Die Muskelzelle bringt das Kunststück fertig, all diese Vorgänge in Millisekunden und hochpräzise ablaufen

zu lassen. Aber wohin pumpt sie das freigesetzte Calcium? Bislang war ein röhrenartiges Membrannetzwerk, das sogenannte Sarcoplasmatische Reticulum, als Hauptspeicher bekannt. Es enthält Ionenkanäle, die Calcium auf die Aktivierung der Muskelzelle hin aus dem Netzwerk entlassen, und es enthält Ionenpumpen, die anschließend das Calcium wieder in das Netzwerk zurückbefördern.

Die Frage war, ob ein zweites, wichtiges Netzwerk bestehend aus sogenannten Mitochondrien ebenfalls an der Aufnahme von Calcium nach der Kontraktion beteiligt ist. Da dieses Netzwerk, das normalerweise für die Bereitstellung der Energieträgermoleküle ATP bekannt ist, keine aktiven Pumpen, sondern nur relativ unsensible, passive Calcium-Ionenkanäle enthält, wurde lange eine Rolle dieses Netz-

werkes am Calciumzyklus von Muskelzellen bezweifelt. Allerdings war auch bekannt, dass es so etwas wie ein Mess- und Regelglied für die Zellphysiologie darstellt: In ihm befinden sich nämlich eine Reihe von Faktoren, die bei Freisetzung zum programmierten Zelltod führen; und diese Freisetzung findet bekanntermaßen in einer Reihe von Zelltypen (für Muskelzellen war das noch nicht bekannt) bei unphysiologisch erhöhtem Calcium-Spiegel statt. Also war zu prüfen, ob das Mitochondriennetzwerk in Muskelzellen im intakten Gewebe Calcium aufnehmen und damit Veränderungen im zellulären Calciumspiegel messen könnte. Wir sind dieser Frage anhand unseres experimentellen Tiermodells und unter Ausnutzung einer Sonde, die Calcium nur in Mitochondrien misst, nachgegangen. Wir konnten auf diese Weise erstmals im lebenden Gewebe nachweisen, dass diese Calcium-Aufnahme tatsächlich unter verschiedenen Bedingungen stattfindet, dass sie aber durch Inaktivierung des Netzwerkes unterbunden werden kann [4]. Im Nachhinein wurden wesentliche Bestandteile dieser Befunde auch durch Untersuchungen anderer Gruppen bestätigt und erlauben im Hinblick auf die Muskeldystrophien eine theoretische Einbeziehung des Mitochondriennetzwerkes in den Mechanismus der Krankheitsentstehung.

Ausblick

Durch Kombination unseres Tiermodells mit der Vielzahl vorhandener und neu zu entwickelnder Sonden und deren Visualisierung mittels moderner bildgebender Me-

thoden haben wir eine neue Plattform für die direkte Beobachtung hochkomplexer und nur im biologischen Gefüge beantwortbarer Fragestellungen entwickeln können [4–6]. Mit dieser Technik konnte bereits erstmals zweifelsfrei die Beteiligung eines neuen Calcium-Depots (der Mitochondrien) im Skelettmuskel beschrieben werden [4]

und Untersuchungen über die Beteiligung dieses Depots an der Entstehung der Muskeldystrophie sind derzeit im Gange. Eine zweite Stoßrichtung unseres Labors befasst sich mit Störungen des Transports von Proteinen zur Verbindungsstelle zwischen Nerv und Muskel im dystrophen Muskel (Abb. 2). Mithilfe des Tiermodells

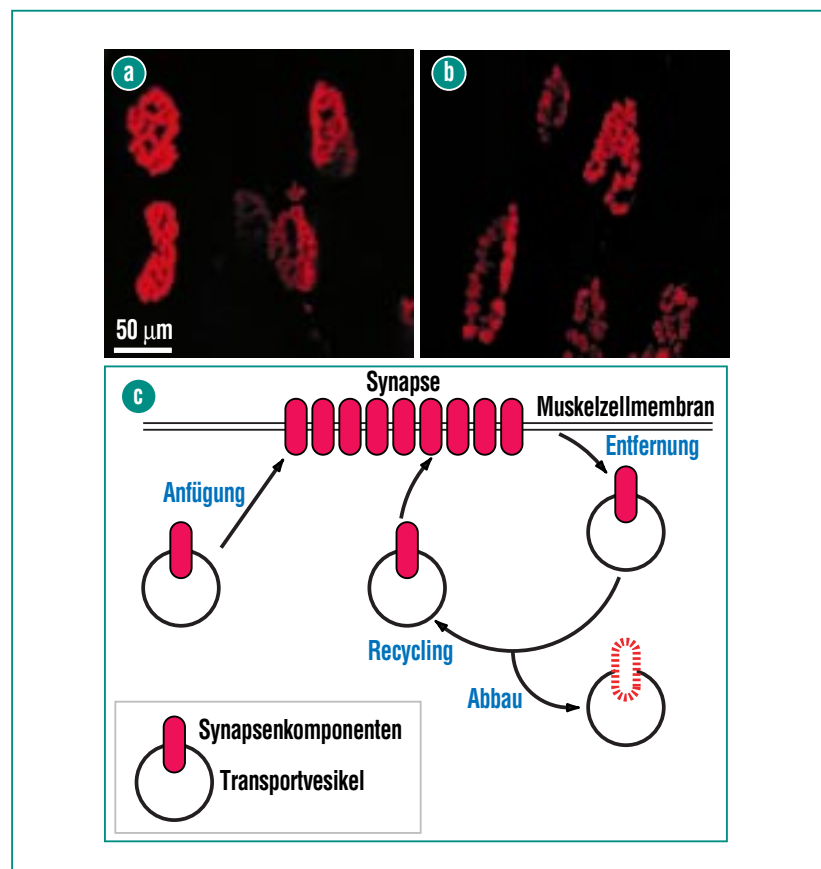


Abb. 2: Schäden an der neuromuskulären Synapse in kranken Muskeln. Struktur, Form und Größe der Muskelsynapse im gesunden (a) und im kranken, dystrophen Säugermuskel (b). Form, Größe und Aufbau der Synapsen sind im dystrophen Muskel krankhaft verändert. c): Schema der Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Muskelsynapse dienen. Komponenten der Synapse werden über Transportvesikel bei Bedarf herangeführt und nach Überalterung oder bei Inaktivität entfernt. Je nach physiologischem Zustand des Muskels können entfernte Komponenten rezykliert oder definitiv abgebaut werden. Wie diese Transportschritte stattfinden und in welchem Maß sie in kranken Muskeln gestört sind, ist Gegenstand unserer Forschung.

konnten wir dort erste Hinweise auf die Beteiligung und Fehlsteuerung bestimmter Motorproteine finden und gehen nun der weiteren Charakterisierung dieser Effekte und deren Rolle für das dystrophe

Krankheitsbild nach. Wir hoffen, auf lange Sicht der molekularbiologischen und genetischen Forschung ein wertvolles und physiologisch aussagekräftiges Modell zur Seite stellen und weiterent-

wickeln zu können, um das Ursache-Wirkung-Gefüge von Muskel-erkrankungen aufzudecken.

Literatur

- [1] E.P. Hoffman, R.H. Brown Jr., L.M. Kunkel, (1987) *Cell* 51, 919-928
- [2] M.W. Berchtold, H. Brinkmeier, M. Muntener, (2000) *Physiol Rev* 80, 1215-1265
- [3] P.R. Turner, T. Westwood, C.M. Regen, R.A. Steinhardt, (1988) *Nature* 335, 735-738
- [4] R. Rudolf, M. Mongillo, P.J. Magalhaes, T. Pozzan, (2004) *J Cell Biol* 166, 527-536
- [5] R. Rudolf, P.J. Magalhaes, T. Pozzan, (2006) *J Cell Biol* 173, 187-193
- [6] J. Tothova, B. Blaauw, G. Pallafacchina, R. Rudolf, C. Argentini, C. Reggiani, S.Schiaffino, (2006) *J Cell Sci* 119, 1604-1611