

Abteilung Vegetative Physiologie

Prof. Dr. med. Gerolf Gros

Mechanismus der Fasertyp-Transformation im Skelettmuskel.

Skelettmuskelfasern unterscheiden sich deutlich in ihren mechanischen und metabolischen Eigenschaften: sie zeigen unterschiedliche Kontraktionsgeschwindigkeit, Kraftentfaltung und Ermüdungsresistenz. Dementsprechend sind unterschiedliche Muskelfasertypen definiert: Typ I-Fasern kontrahieren langsam und weisen eine hohe Ermüdungsresistenz auf, Typ IIA-Fasern kontrahieren schnell und sind ermüdungsresistent, Typ IIB-Fasern kontrahieren schnell und ermüden schnell. Diesen Eigenschaften liegt eine unterschiedliche Ausstattung der Fasertypen mit Isoformen kontraktiler Proteine, wie z.B. Myosin, und mit Stoffwechsel-enzymen zu Grunde. Da Muskelfasern nicht in ihrem Fasertyp determiniert sind und sich auf Grund chronischer Belastung (z.B. Ausdauertraining) oder Entlastung (z.B. Denervierung) von einem Fasertyp in einen anderen umwandeln, müssen Signale in der Muskelzelle die Genexpression so regulieren, dass sich der schnelle oder der langsame Fasertyp entwickelt. Diese Signale sind offenbar vom Innervationsmuster des die Faser versorgenden Motoneurons gesteuert. Das Motoneuron ist somit neben der Steuerung der Kontraktionen auch entscheidend für die Fasertypentwicklung und die Muskelatrophie. Um die Signalkaskaden, die an der Ausbildung eines bestimmten Fasertyps beteiligt sind, besser untersuchen zu können, verwenden wir ein primäres Zellkultursystem von Skelettmuskelzellen vom Kaninchen. Diese Muskelzellen reifen in Suspensionskultur auf Microcarriern zu Myotuben mit vielen Eigenschaften adulter Typ II-Fasern aus. Wir haben gezeigt, dass die Umwandlung einer schnell kontrahierenden Typ-II-Muskelzelle durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst werden kann. Diese Muskelfasertyp-Umwandlung entspricht der Anpassung des Muskels, die man in vivo unter Ausdauertraining beobachtet. Das Calciumsignal wird über die Aktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin und die nachfolgende Dephosphorylierung eines Transkriptionsfaktors induziert. Der Transkriptionsfaktor NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T Cells) wird in der dephosphorylierten Form in den Zellkern transportiert und ermöglicht hierdurch die Expression von einigen Fasertyp-I-spezifischen Genen, also von solchen des langsam kontrahierenden Fasertyps. Ausgehend von diesen Ergebnissen wollten wir untersuchen, welche Stimulationsmuster (in vivo durch das Motoneuron erzeugt) zu einer Umwandlung in eine Typ-I Faser führt und welche zu einer Beibehaltung der Typ-II Faser führt. Gleichzeitig wollten wir die intrazellulären Signal-kaskaden identifizieren, die die Ausbildung einer Typ I Myotube einerseits und einer Typ II Myotube andererseits vermitteln.

Methode

Primäre Skelettmuskelzellen vom Kaninchen wurden auf Microcarriern kultiviert und nach Reifung zu adulten Typ-II-Myotuben mit verschiedenen Reizmustern über einige Tage bis zu zwei Wochen elektrostimuliert. Zur Identifizierung des Fasertyps wurde die Expression schwerer Myosinketten-Isoformen auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Zusätzlich wurde durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie die intrazelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors NFATc1 bestimmt, dessen Aktivität im Zellkern offenbar unerlässlich für eine Expression des Typ-I Myosins ist.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt die verwendeten Reizmuster. Es wurden 45 minütige Reizzyklen verwendet, die in Stimulationszeiten (ON-Phasen) und Ruhezeiten (OFF-Phasen) aufgeteilt waren. Diese Zyklen wurden kontinuierlich für Tage bis Wochen wiederholt. Während der ON-Phasen wurden Stimuli mit einer Reizdauer von 2,5 ms und einer Frequenz zwischen 1 und 10 Hz appliziert.

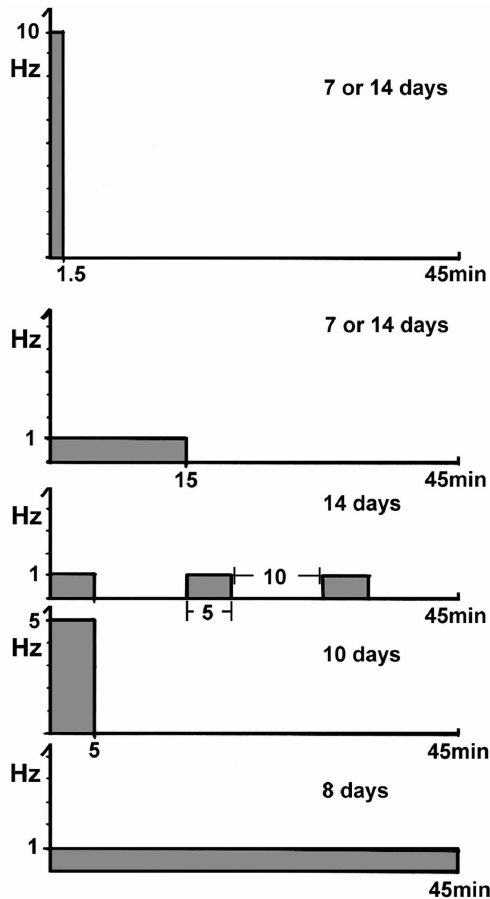


Abb. 1: Elektrostimulations-Muster. Grau: ON-Phasen.

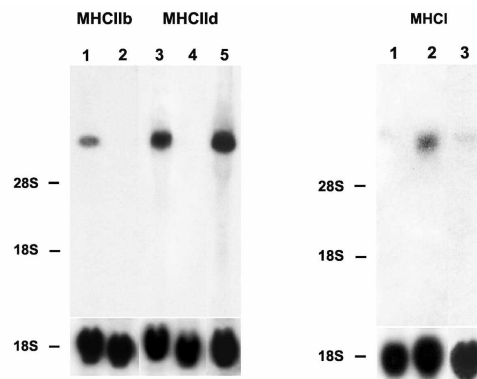


Abb. 2: Northern Blot von Gesamt-RNA aus chronisch elektrostimulierten Muskelzellen. Spur 1 (linker und rechter Bildteil)= unstimulierte Kontrollzellen; Spur 2 u. 4 (links) und Spur 2 (rechts) = Reizmuster 15 min 1Hz / 30 min Pause; Spur 3 u.5 (links) und Spur 3 (rechts) = Reizmuster 1,5 min 10Hz/ 43,5 min Pause.

Abb. 2 zeigt die Expression der schweren Myosinkette des Typ-I (MHC I) und zweier verschiedener Typ-II Myosin-Isoformen (MHC IIb und MHC IIId) auf mRNA-Level nach zweiwöchiger Stimulation mit zweien dieser Reizmuster. Das erste Muster (li: 3 + 5; re: 3) bestand aus einer ON-Phase mit 10 Hz für 1,5 min, gefolgt von einer Pause (OFF-Phase) von 43,5 min. Das zweite Muster (li: 2 + 4; re: 2) umfaßte eine ON-Phase mit 1 Hz für 15 min, gefolgt von einer 30-minütigen OFF-Phase. Diese Muster wurden kontinuierlich zwei Wochen lang appliziert. Wie man auf den Northern-Blots erkennen kann, führt das Muster mit der 15 min andauernden ON-Phase zu einer Zunahme der MHC I Expression (s. Spur 2, rechter Abbildungsteil) und zu einer Abnahme der schnellen Myosin-Isoformen MHC IIb und MHC IIId (linker Abbildungsteil, Spur 2 und 4) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen (Spur 1 im linken und rechten Abbildungsteil). Dieser Versuch zeigt eine deutliche Umwandlung des Fasertyps vom schnellen Typ II hin zum langsamen Typ I, wenn mit der 15-minütigen ON-Phase gereizt wurde, wogegen das Muster mit der 1,5-minütigen ON-Phase den schnellen Fasertyp-II begünstigt. Dieser Unterschied in der Reaktion auf die Stimulation ist nicht von der Gesamtbelastung abhängig, da beide Muster den Zellen die gleiche Arbeitsbelastung abverlangten. Weitere Versuche mit den in Abb. 1 gezeigten Reizmustern lassen erkennen, dass die kürzeste ON-Phase in einem 45- Minutenzyklus bei ~5 Minuten liegen muß, um eine Fasertransformation vom schnellen Typ II zum langsamen Typ I induzieren zu können. Tab. 1 zeigt eine quantitative Analyse der Myosinexpression auf Proteinebene. Myosinextrakte der mit verschiedenen Reizmustern stimulierten Zellen und der Kontrollzellen wurden elektrophoretisch getrennt und nach Färbung quantifiziert. Sämtliche Reizmuster, die eine Reizdauer 5 Minuten im 45 Minutenzyklus besaßen zeigten eine signifikante Zunahme des langsamen Myosins (MHC I) und eine Abnahme des schnellen Myosins (MHC IIId u. IIb). Dies belegt, dass eine Muskelzelle innerhalb eines Reizzyklus über eine bestimmte Mindest-Zeitspanne innerviert oder stimuliert werden muß, um sich zu einer langsamen Typ I - Faser zu entwickeln.

Stimulationsmuster	Dauer	MHC-Isoformen [%]		MW±SD	
		Ila	Ild	Ilb	I
-----	21 Tage; n=15	7 ±14	69 ±19	23 ±21	1 ±3
-----	28 Tage; n=12	3 ±5	73 ±14	24 ±11	1 ±3
ON:1.5min n 10 Hz OFF: 43.5 min Beginn ab 14.Tag in Kultur	7 Tage n=3	0	79 ±9	22 ±9	0
ON:15min 1 Hz OFF: 30 min Beginn ab 14.Tag in Kultur	7 Tage n=6	49 ±17	27 ±14	0	24 ±13 *
Beginn ab 14.Tag in Kultur	14 Tage n=9	34 ±28	14 ±18	0	52 ±37 *

ON:5 min 1 Hz OFF: 10 min Beginn ab 14.Tag in Kultur	14 Tage n=4	61 ±13	12 ±8	0	24 ±3 *
ON:5 min 5 Hz OFF: 40 min Beginn ab 14.Tag in Kultur	10 Tage n=3	50 ±16	15 ±14	0	35 ±28 *
kontinuierlich 1 Hz Beginn ab 14.Tag in Kultur	8 Tage n=3	57 ±21	19 ±26	0	25 ±6 *

Tabelle 1: Anteile der Isoformen der schweren Myosinketten (MHC) in stimulierten Muskelzellen und Kontrollzellen. * = signifikant p 0.05. Dunn's post-Test nach Kruskal-Wallis

Die Umwandlung des Fasertyps ist schon nach 24-stündiger Reizung mit einem Reizzyklus von 15min 1 Hz / 30min Pause im Northern Blot der mRNA schwerer Myosinketten (MHC) erkennbar (Abb. 3) und zeigt somit, dass die Fasertransformation bereits nach einem Tag Elektrostimulation eingesetzt hat.

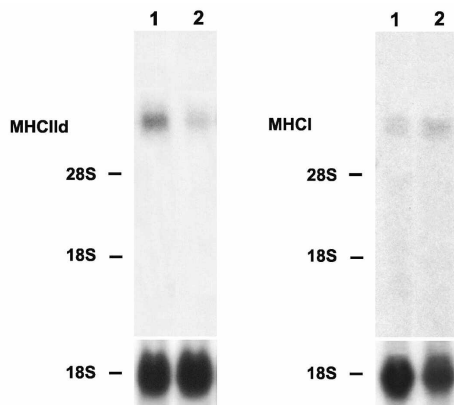


Abbildung 3: Northern Blot Analyse der MHC-mRNA von 24 Stunden mit einem Reizmuster: 15min 1 Hz / 30min Pause stimulierten Zellen (Spur 2 links und rechts), sowie ungereizten Muskelzellen (Spur 1 links und rechts).

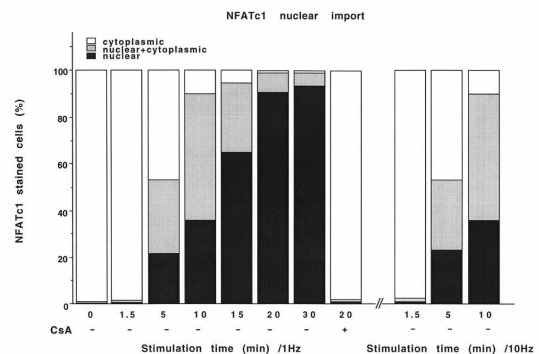


Abb. 4: Kernimport von NFATc1 in Muskelzellen während Elektrostimulation.

Abb. 3 illustriert diesen Sachverhalt: es ist eine klare Abnahme des schnellen Myosintranskripts (MHC IId) und eine erkennbare Zunahme der langsamen MHC I gegenüber den ruhenden Kontrollzellen zu verzeichnen.

Die für die Induktion eines langsamen Fasertyps erforderlichen Zeitfenster kontinuierlicher Stimulation warfen die Frage nach dem Mechanismus auf, der die Muskelzelle dazu befähigt die Zeitdauer in der sie stimuliert wurde in unterschiedliche Genaktivität umzusetzen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Muskelzellen stimuliert und nach verschiedenen Zeiten wurde

die intrazelluläre Lokalisation des für die Expression des langsamen Myosins unerlässlichen Transkriptionsfaktors NFATc1 bestimmt. Eine Lokalisation im Zellkern bedeutet, dass der Transkriptionsfaktor aktiviert wurde und somit die Transkription von bestimmten Genen einschalten und unterhalten kann. Eine Lokalisation im Zytoplasma hingegen bedeutet, daß NFATc1 in der inaktiven Form vorliegt.

Abb. 4 zeigt die Auswertung der Immunfluoreszenz-Analyse. Die Abb. zeigt, dass nach nur 1,5 Minuten Dauer-Reizung NFATc1 vollständig in der inaktiven Form vorliegt und erst nach einer Reizdauer von mindestens 5 Minuten ein Teil des Transcriptionsfactors in der aktiven intranukleären Form vorliegt. Nach ungefähr 20 Minuten Dauerstimulation ist NFATc1 ausschließlich in der nukleären, aktiven Form zu finden. Dieser Kernimport von NFATc1 ist offenbar unabhängig von der Stimulations-Frequenz, denn eine Verzehnfachung der Reizfrequenz verändert nicht die Geschwindigkeit des Imports (Abb. 4, rechts).

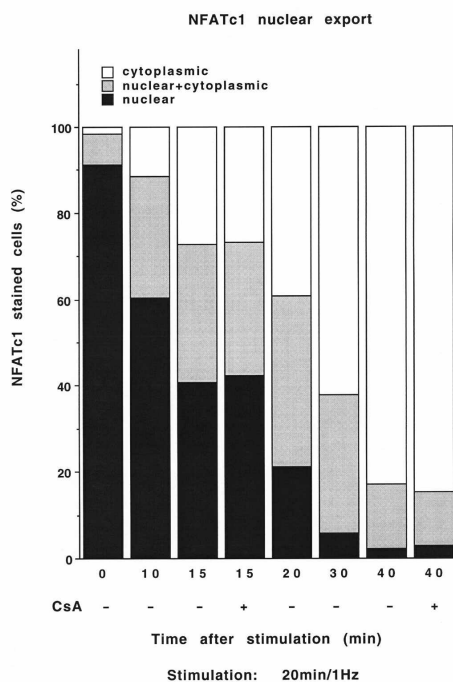


Abb. 5: Export von NFATc1 aus dem Zellkern nach Beendigung einer 20-minütigen Elektrostimulation der Muskelzellen.

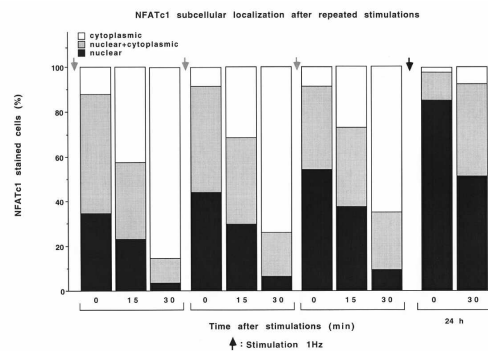


Abb. 6: Lokalisation von NFATc1 während wiederholter Stimulation mit dem Reizmuster ON-Phase=10min bei 1Hz, OFF-Phase=30min.

Der Export, also die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors nach Ende einer 20-minütigen Stimulation mit 1 Hz ist in Abb. 5 dargestellt. NFATc1 wird demnach etwas langsamer aus dem Kern exportiert als importiert, nach 40 Minuten ist NFATc1 noch nicht wieder vollständig in das Zytoplasma zurückgekehrt. Abb. 6 zeigt die Konsequenz für die nukleäre NFATc1-Anreicherung, wenn die Dauer der ON-Phase zu einem Kernimport führt und die Dauer der OFF-Phase einen vollständigen Export von NFATc1 nicht erlaubt. In Abb. 6 wurden Muskelzellen repetitiv mit einem Reizzyklus von 10 min bei 1 Hz, gefolgt von 30 Minuten Pause, stimuliert. Die Lokalisation von NFATc1 wurde nach Ende nur eines Reizzyklus (Periode ganz links) und nach Beendigung zweier Reizzyklen (2. Periode von links) und dreier Reizzyklen (3. Periode von links) bestimmt. In der Tat reichert sich mit jedem Reizzyklus zunehmend NFATc1 in den Zellkernen an. Nach 24 Stunden kontinuierlicher Reizung befindet sich NFATc1 am Anfang der Reizpause zu fast 100 % in den Zellkernen (ganz rechts), wohingegen es nach nur einer 10-minütigen Reizperiode nur ~35% sind (ganz links).

Dieses Ergebnis belegt, dass Reizzyklen mit ON-Phasen einer Mindestdauer von 5 min und OFF-Phasen einer Maximaldauer von ca. 30 min zu einer Anreicherung von NFATc1 führen und somit den langsamen Typ-I Fasertyp sehr effektiv induzieren. Andere Muster aber, die zu kurze ON-Phasen besitzen, vermutlich auch solche die zu lange OFF-Phasen besitzen, führen nicht zu einer Anreicherung des Transkriptionsfaktors und stabilisieren damit den schnellen Fasertyp II. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit von Reizmustern sich auf der Basis der Import- und Export-Kinetik von NFATc1 vollständig erklären läßt. Somit scheint das Aktivitätsmuster des α -Motoneurons via Calcium-Calcineurin-NFATc1 in der Muskelzelle über die Expression der fasertypspezifischen Myosinketten-Isoform und damit über die Ausprägung der Muskelfaser in Typ I oder Typ II zu entscheiden.

Mitarbeiter: H.P. Kubis, J.D. Meißner, R. Scheibe, M. Scholz, N. Hanke, G. Gros. Förderung: DFG Gr 489/13-1/-2

Weitere Forschungsprojekte

Diffusivität von Myoglobin in Herz- und Skelettmuskelzellen.

Myoglobin ist ein sauerstoffbindendes Hämprotein in Muskelzellen. Es fungiert als Sauerstoffspeicher und kann in kurzen Phasen eines Abfalls des Gewebs- P_{O_2} die Sauerstoffversorgung der Zellen überbrücken, so z.B. im Herzmuskel während der Systole, in der die Kammerdurchblutung fast sistiert. Eine weitere denkbare Funktion des Myoglobins ist es, daß die intrazelluläre Diffusion von Oxymyoglobin zu einem nennenswerten intrazellulären O_2 -Transport führt, der die Diffusion von physikalisch gelöstem Sauerstoff ergänzt und den O_2 -Transport von der Zellmembran bis zum Mitochondrium unterstützt. Um diese Hypothese zu prüfen, messen wir die Diffusivität von Myoglobin im Cytoplasma intakter Herz- und Skelettmuskelzellen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Diffusionsfähigkeit von Myoglobin in diesen Zellen sehr niedrig ist, sodaß es unwahrscheinlich ist, daß Myoglobindiffusion wesentlich zum intrazellulären O_2 -Transport beiträgt. Mit Hilfe von Modellrechnungen wollen wir untersuchen, welche Rolle Oxymyoglobin als O_2 -Lieferant z.B. im Herzmuskel während der Systole bei den experimentell gefundenen Diffusionseigenschaften tatsächlich spielen kann.

Mitarbeiter: K.D. Jürgens, G. Gros

Muskelfunktion von Carboanhydrase II- und Carboanhydrase III-defizienten Mäusen.

Beide Carboanhydrase-Isoenzyme scheinen eine nicht bzw. nur teilweise verstandene Rolle für die Funktion von Skelettmuskeln, Muskelkontraktion und/oder Muskelstoffwechsel, zu spielen. Wir untersuchen die kontraktile Eigenschaften von Faserbündeln aus Hinterlaufmuskeln der beiden knockout-Mäuse, von denen wir hier eine Zucht aufgebaut haben. Daneben werden die Muster der Isomyosine und einige Stoffwechsel-Leitenzyme in diesen Muskeln untersucht, um evtl. erfolgte Anpassungen zu erfassen. Bisherige Ergebnisse zeigen, daß die Kontraktionszeiten der Muskeln von Carboanhydrase II-defizienten Tieren stark verlangsamt sind. Um diesen Befund interpretieren zu können, soll die noch unklare subzelluläre Lokalisation der Carboanhydrase II im Muskeln ergänzend untersucht werden.

Mitarbeiter: M.D. Beekley, P. Wetzel, H.P. Kubis, C. Geers-Knörr, G. Gros. Kooperation: R. Levine, NIH, Bethesda, USA

Membrangebundene Carboanhydrasen im Skelettmuskel

Nach dem erfolgten physiologischen Nachweis wichtiger Funktionen einer extrazellulären (sarkolemmalen) und einer intrazellulären (L-System) membrangebundenen Carboanhydrase für Milchsäureabgabe, Muskelkontraktion und Ca^{++} -Transient soll die Identität dieser Enzyme aufgeklärt und ihre vermutete subzelluläre Lokalisation überprüft werden.

Mitarbeiter: P. Wetzel, C. Geers-Knörr, G. Gros.

Membrangebundene Carboanhydrase im Herzen

Die membrangebundene Carboanhydrase von Cardiomyocyten stellt nach bisherigen Untersuchungen ein bisher nicht bekanntes Isoenzym dar. Wir haben dieses Isoenzym nach der Isolation humaner Cardiomyocyten aus deren Membranfraktion durch Affinitätschromatographie rein dargestellt. Nach Bestimmung der Primärstruktur des Isoenzym sollen Antikörper erzeugt und zur Bestimmung seiner ultrastrukturellen Lokalisation eingesetzt werden. Längerfristiges Ziel ist die Aufklärung der Funktion dieser Carboanhydrase für die Cardiomyocyten.

Mitarbeiter: H.P. Kubis, C. Geers-Knörr, G. Gros. Kooperation: IPF, Prof. Forßmann.

Carboanhydrase im gastrointestinalen Mucus

Nach dem Nachweis hoher Aktivitäten von Carboanhydrase im Mucus und deren Charakterisierung als ein besonderes Isoenzym, sollen folgende Ziele verfolgt werden: 1. Aufklärung der Primärstruktur von Mucuscarboanhydrase vom Meerschweinchen und vom Menschen, Erzeugung von Antikörpern und Identifizierung des Synthesorts im Magen-Darm-Trakt. 2. Überprüfung einer Arbeitshypothese zur Funktion dieser Carboanhydrase, wonach die Anwesenheit dieses Enzyms im Mucus die unter der Mucusschicht liegenden Epithelzellen vor den hohen im Lumen von Darm und Magen herrschenden CO_2 -Partialdrücken (bis zu 0,5 atm) schützt. Hierzu werden CO_2 -Mikroelektroden eingesetzt.

Mitarbeiter: V. Endeward, P. Wetzel, G. Gros.

CO_2 -Permeabilität biologischer Membranen

Wir haben Hinweise dafür, daß die Permeation von CO_2 durch biologische Membranen auch durch Membranproteine vermittelt wird. Umgekehrt gibt es Hinweise darauf, daß einige Membranen (in Darm, Magen, Harnblase) extrem schlecht permeabel für CO_2 sind. An *Xenopus*-Oocyten und Erythrocyten haben wir mit einer massenspektrometrischen Methode Evidenz erhalten, daß der Wasserkanal Aquaporin-1 einen Transportweg für CO_2 darstellt. Durch Untersuchungen der Erythrocyten von Aquaporin-1-defizienten Menschen und von Bande-3-Protein (= HCO_3^- - Cl^- -Antiporter)-defizienten Mäusen erhielten wir darüberhinaus Hinweise, daß neben Aquaporin-1 das Bande-3-Protein einen wichtigen Transportweg für CO_2 an Zellmembranen darstellen kann. Letzteres wurde auch bestätigt bei Untersuchungen an Erythrocyten des Schleimaals, denen das Bande-3-Protein fehlt. Die Messungen der CO_2 -Permeabilität an Oocyten sollen durch die Anwendung der CO_2 -Mikroelektrode ergänzt werden. Nach Abschluß der Untersuchungen an den "Modellzellen" Oocyten und Erythrocyten soll an den Epithelien von Colon und Magen untersucht werden, welche Transportwege für die hohen Permeabilitäten einiger (vor allem der basolateralen) Membranen verantwortlich sind, und welche Mechanismen für sehr schlechte Permeabilität anderer (vor allem apikaler) Membranen verantwortlich sind.

Mitarbeiter: V. Endeward, T. Peters, C. Franke, G. Gros. Kooperationen: W.F. Boron, Yale University, USA; P. Agre, Johns-Hopkins University, USA; L. Peters, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA; K. Kaila, Helsinki, Finnland.

Originalarbeiten:

Meißner, JD, Gros, G, Scheibe, RJ, Scholz, M, Kubis, HP. Calcineurin regulates slow myosin, but not fast myosin or metabolic enzymes, during fast-to-slow transformation in rabbit skeletal muscle cells in culture. J Physiol 2001; 533: 215-226

Papadopoulos, S, Endeward, V, Revesz-Walker, B, Jürgens, KD, Gros, G. Radial and longitudinal diffusion of myoglobin in single living heart and skeletal muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:5904-5909

Wetzel, P, Hasse, A, Papadopoulos, S, Voipio, J, Kaila, K, Gros, G. Extracellular carbonic anhydrase activity facilitates lactic acid transport in rat skeletal muscle fibres. J Physiol 2001; 531:743-756

Bücher, Buchbeiträge, Lehrbücher:

Jürgens, KD. Physiologie und Pathophysiologie. Fernuniversität Gesamthochschule Hagen; 2001

Abstracts:

(2001 wurden 3 Abstracts publiziert)

Abgeschlossene Promotionen/Diplomarbeiten:

Hanke, N (Dipl.Biochem.): Intrazelluläre Calcium-Konzentration in elektrostimulierten Myotuben während der Weiß-Rot-Fasertransformation.