

Zusammenfassung

Charakterisierung des Sarkolems in Gliedergürtelmuskeldystrophie

Als Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD) bezeichnet man eine heterogene Gruppe von Muskeldystrophien, die sich durch einen langsam progressiven Krankheitsverlauf mit Schwächung der Skelettmuskulatur und erhöhten Kreatinkinasewerten auszeichnet. Mutationen im Dysferlin-Gen führen klinisch in den meisten Fällen zu zwei unterschiedlichen Ausprägungen; der Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B mit primärem Befall der proximalen Skelettmuskulatur der Extremitäten und der Miyoshi Myopathie mit Beeinträchtigung der distalen Muskulatur. Beide Myopathien werden autosomal-rezessiv vererbt und als Dysferlinopathien zusammengefasst. Skelettmuskel von Patienten mit LGMD Typ 2B zeigt dystrophe Veränderungen ähnlich zu anderen Muskeldystrophien, aber auch histologische Besonderheiten wie die Akkumulierung von subsarkolemaren Vesikeln. Dysferlin ist ein Transmembranprotein, welches primär am Sarkolemm von Skelettmuskel aber auch in entwickelnden T-Tubuli und innerhalb der Muskelfaser lokalisiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass Dysferlin eine zentrale Rolle in der Membranreparatur von Muskelzellen nach Verletzung spielt. Intrazelluläre Lokalisation des Proteins in primären Muskelzellen zeigt neben der Lokalisierung an der Zellmembran ebenfalls eine Assoziation zu zytosolischen Vesikeln, deren Funktion noch unklar ist. Eine weitere Form der Gliedergürtelmuskeldystrophie, die autosomal-dominant vererbte LGMD Typ 1C, wird durch Mutationen im Caveolin-3-Gen hervorgerufen. Caveolin-3 ist eine muskelspezifische Isoform der Caveolinproteinfamilie, welche eine wichtige strukturelle- sowie funktionelle Komponente von Caveolae darstellt. Caveolae sind Plasmamembraneinstülpungen von 40 bis 80nm Durchmesser, die eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen wie zum Beispiel der Signaltransduktion, der Endozytose und dem Lipid- und Cholesterolfstoffwechsel spielen. Sie unterscheiden sich essenziell in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung von ihrer Membrenumgebung und stellen dadurch dynamische funktionelle Einheiten dar, die auch als „Lipid rafts“ bezeichnet werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass Caveolin-3 die Lokalisierung und Endozytoserate von Dysferlin an der Plasmamembrane reguliert, wobei die genaue molekulare Interaktion beider Proteine unklar bleibt. Die Gliedergürtelmuskeldystrophie LGMD Typ 2L zeigt im klinischen Bild eine große Ähnlichkeit zur LGMD Typ 2B. Sie wird autosomal-rezessiv vererbt und durch Mutationen im Anoctamin-

5-Gen hervorgerufen. Anoctamin-5 gehört zu der Anoctaminproteinfamilie, die durch bestimmte Proteinstruktureigenschaften charakterisiert ist. Proteine der Anoctaminfamilie bestehen aus acht Transmembrandomänen und wirken als Kalzium-aktivierte Chloridkanäle. Ziel der Studie war demnach zu untersuchen, ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen Dysferlin, Caveolin-3 und Anoctamin-5 innerhalb der Muskelzelle gibt.

Um die molekularen Prozesse, die zu LGMD führen, zu entschlüsseln, wurden Untersuchungen an primären Zelllinien, isoliert aus Skelettmuskelbiopsien von LGMD-Patienten mit Mutationen in Dysferlin, Caveolin-3 und Anoctamin-5, durchgeführt. Die humanen Muskelzellen wurden zu vielkernigen Myotuben differenziert und mit Hilfe von immunhistologischen und proteinbiochemischen Methoden charakterisiert. Die Ultrastruktur der Plasmamembran wurde mittels Elektronenmikroskopie näher untersucht. Endozytotische membranäre Strukturen wie Caveolae, Plasmamembranvesikel und „Clathrin-coated pits“ konnten quantifiziert werden. Um die Interaktion von Dysferlin und Caveolin-3 in funktionellen Zusammenhang mit „Lipid Rafts“ zu bringen, wurden diese aus LGMD Typ 2B-Myotuben biochemisch aufgereinigt. Eine Methode zur Aufreinigung von morphologisch intakten, intrazellulären Dysferlinvesikeln wurde etabliert und durch mikroskopische und biochemische Methoden weiter untersucht. Eine detaillierte Charakterisierung des Proteingehalts dieser Vesikel wurde mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie durchgeführt.

Durch immunozytologische Studien an humanen Skelettmuskelzellen konnten nachgewiesen werden, dass Dysferlin und Caveolin-3 in intrazellulären, vesikulären Strukturen zu finden sind und ebenfalls partiell an der Zellmembran kolokalisieren. Biochemische Untersuchungen an „Lipid rafts“ konnten zeigen, dass Dysferlin an diese assoziiert ist und in Zusammenhang mit dem Aktin-Zytoskelett wirkt. Ein weiterer Nachweis für eine funktionelle Interaktion von Dysferlin mit „Lipid rafts“ konnte, durch elektronenmikroskopische Analysen der Zellmembran von Muskelzellen von LGMD Typ 2B-Patienten, erbracht werden. Die Anzahl der Caveolae, ein Subtyp von „Lipid rafts“, an der Plasmamembran zeigt eine Korrelation mit der Ausprägung verschiedener Dysferlinmutationen. Myotuben von LGMD Typ 1C-Patienten hingegen sind bezüglich ihrer Caveolaemorphologie sowie –anzahl nicht beeinträchtigt. Die Charakterisierung von intrazellulären Dysferlinvesikeln bestätigte die Spezifität der Aufreinigungsmethode, da Dysferlin selektiv angereichert werden konnte und bereits beschriebene Dysferlininteraktionspartner wie Annexin A1 und A2, Ahnak und PTRF (polymerase I and transcript release factor) bestätigt werden konnten. Es wurden circa 500 Dysferlin-spezifische Proteine detektiert, die diversen zellulären Mechanismen wie zum Beispiel dem Vesikeltransport, der Endo- und Exozytose aber auch möglicherweise neuen Dysferlinfunktionen zugeordnet werden können.

Ergebnisse dieser Studie bestätigen, dass Dysferlin und Caveolin-3 in engem funktionellen Zusammenhang stehen und dass Caveolae eine entscheidende Rolle im Kontext von LGMD spielen. Wir konnten zeigen, dass Dysferlin neben der Zellmembran wesentlich auch in intrazellulären zytosolischen Vesikeln lokalisiert ist. Diese dysferlinhaltigen Vesikel scheinen eine wesentliche Rolle in multiplen zellulären Prozessen wie dem vesikulärem Transport, der Endo- und Exozytose, der Zelladhäsion, der Aktin-regulierten Signaltransduktion sowie „Lipid raft“-Dynamiken zu spielen. Diese im Laufe meiner Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen die vielfältigen Funktionen von Dysferlin im Skelettmuskel zu dechiffrieren und legen dadurch einen wesentlichen Grundstein für die Entwicklung neuer Therapien.