

Dynamik von Acetylcholinrezeptoren in neuromuskulären Synapsen *in vivo*

Yampolsky, Pessah; Pacifici, Pier-Giorgio; Chevessier, Frédéric; Mersdorf, Ulrike; Barenhoff, Karina; Koenen, Michael; Witzemann, Veit

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg

Korrespondierender Autor

Email: Witzemann@mpmf-heidelberg.mpg.de

Zusammenfassung

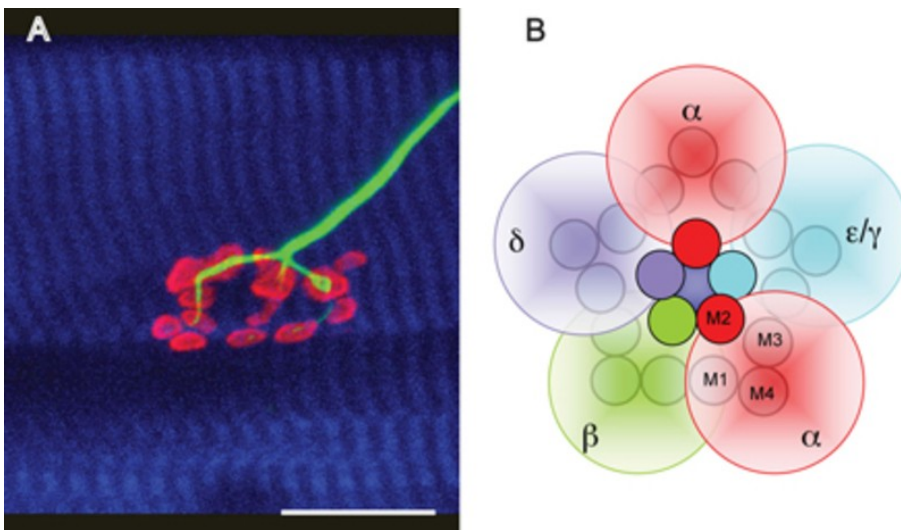
Synaptogenese und synaptische Plastizität erfordern Wechselwirkungen zwischen prä- und postsynaptischen Komponenten. Mithilfe von gentechnisch manipulierten Mäusen wurde die Dynamik von Acetylcholinrezeptoren am Modell der neuromuskulären Synapse untersucht. Direkte *In-vivo*-Untersuchungen zeigen, wie neue Rezeptoren in bestehende Synapsen eingebaut werden und wie sich ihre Stabilität in Abhängigkeit vom Innervierungszustand verändert.

Abstract

Synaptogenesis and synaptic plasticity require interactions between pre- and postsynaptic components. The neuromuscular synapse as model and genetically manipulated mice were used to study the dynamics of acetylcholine receptors. Direct in vivo analysis shows how newly synthesized receptors are integrated into the existing synapse and how receptor stability changes when muscle is inactivated by innervation.

Synapsen sind spezialisierte Kontakte zwischen zwei Nerven oder einem Nerv und einer nicht neuronalen Zelle, wie zum Beispiel die neuromuskuläre Synapse (NMS) in Skelettmuskeln. Mithilfe der Synapsen werden komplexe neuronale Netzwerke angelegt, durch die Lernen, Gedächtnis und insgesamt die Kontrolle aller Lebensfunktionen, einschließlich der Bewegung und Atmung, ermöglicht und gesteuert werden.

Die NMS (**Abb. 1A**) hat als lange bekanntes Modellsystem entscheidend zur Aufklärung der chemischen Neurotransmission durch Acetylcholin beigetragen. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR) war dem auch der erste Neurotransmitterrezeptor und Ionenkanal, der strukturell und funktionell charakterisiert werden konnte, und der erste Rezeptor, der mit gentechnischen Methoden untersucht wurde.



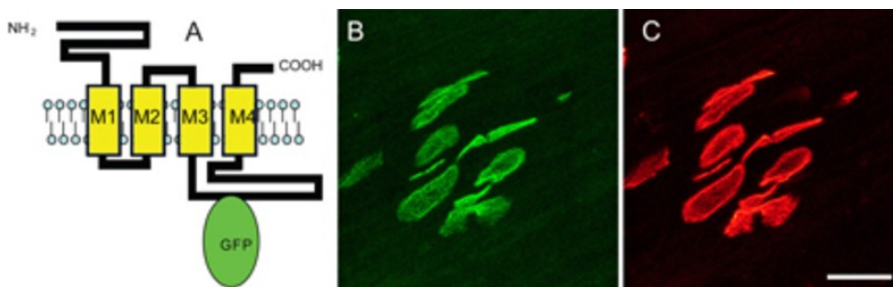
Neuromuskuläre Synapse im Daphragma (Zwerchfell). (A) Motoneuronen (grüne Fluoreszenz durch Färbung nervenspezifischer Neurofilamente) bilden spezifische Kontakte mit Muskelfasern (blaue Fluoreszenz markiert Muskel-spezifische Myosine). An den Kontaktstellen in den Muskelfasern bilden sich postsynaptische Spezialisierungen, die motorischen Endplatten (rote Fluoreszenz zeigt eine Endplatte durch Markierung der postsynaptischen AChR mit Protanin-Burkartoxin). (B) Schematische Darstellung des AChR-Komplexes bestehend aus zwei α - und je einer β -, δ - und γ - (embryonal) oder ϵ - (adult) Untereinheit. Alle Untereinheiten enthalten vier Transmembranbereiche M1-M4, wobei die M2-Bereiche den Ionenkanal bilden (Skalierung: 20 nm).

© Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Rezeptor-induzierte postsynaptische Ströme werden entwicklungsabhängig schneller

Im Muskel enthalten die embryonalen AChR (AChR γ) zwei α -, und je eine β -, γ - und δ -Untereinheit. Die γ -Untereinheit wird in adulten Rezeptoren (AChR ϵ) durch die ϵ -Untereinheit ersetzt (**Abb. 1B**) [1]. Die Kanalconversion hat zur Folge, dass die "Kanaloffenzeit" verkürzt und die Ionenleitfähigkeit erhöht wird und eine schnellere Signalübertragung zur Optimierung der Feinmotorik ermöglicht wird. Darüber hinaus haben die beiden Rezeptortypen noch weitere unterschiedliche Funktionen: AChR ϵ werden weitgehend Synapsen-spezifisch exprimiert und garantieren die hohe synaptische Konzentration und Stabilität der postsynaptischen Struktur [2]. Die AChR γ haben andererseits die Aufgabe, synaptische Kontaktstellen während der Entwicklung an der richtigen Stelle auf der Muskelfaser zu lokalisieren [3]. Somit sind die Rezeptoren nicht nur Signalvermittler, sondern haben zusätzliche regulatorische Funktionen bei der Bildung und Stabilisierung von Synapsen.

Ein Ziel war es, die AChR-Kanalconversion direkt zu verfolgen, um zu sehen, wie neue Rezeptoren in die postsynaptische Membran eingebaut werden. Dazu wurde eine gentechnisch veränderte Maus hergestellt, die AChR $\gamma^{GFP/\gamma^{GFP}}$ -Maus [4], in der das grün fluoreszierende Protein (GFP) in das Gen der AChR γ -Untereinheit eingefügt wurde (**Abb. 2A**).



Die γ -GFP-Untereinheit und grün-fluoreszierende Rezeptoren. A) Schematische Darstellung der γ -GFP-Untereinheit mit GFP in cytoplasmatischen Loop. B) Die modifizierte Untereinheit wird exprimiert und in den AChR γ GFP-Komplex eingebaut, der dann korrekt zur postsynaptischen Membran transportiert wird. Endplatten in Diaphragmamuskel sind während der frühen postnatalen Entwicklung direkt anhand der Grünfluoreszenz sichtbar. C) Endplatten wie in B, dargestellt durch Rhodamin-Biagarotoxin markierte AChR. (Skalierung 20 μ m)

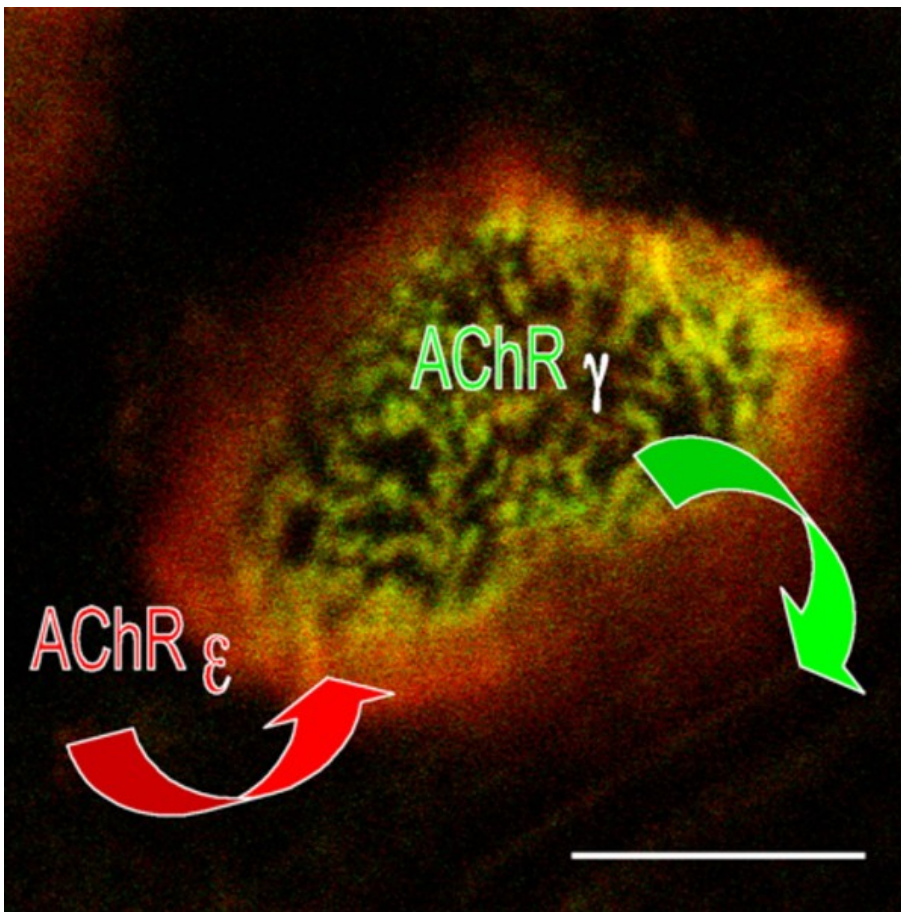
©Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Muskel- versus Nerv-induzierte Kanalkonversion

Beobachtungen, dass ϵ enthaltende Rezeptoren in Mäusen erst nach der Geburt in signifikanter Zahl auftreten, streng auf postsynaptische Bereiche begrenzt bleiben und ihre Expression durch Faktoren neuronalen Ursprungs experimentell induziert werden kann, sprachten für eine neuronal induzierte Kanalkonversion. Dass auch muskelspezifische Faktoren die Expression von AChR ϵ induzieren, stellt den Einfluss von neuronalen Faktoren in Frage. In AChR $\gamma^{GFP\gamma^{GFP}}$ -Mäusen konnte der Austausch der AChR γ AChR ϵ Proteinkomplexe direkt *in vivo* verfolgt werden. Wegen einer stark reduzierten γ -GFP-Expression und unveränderter Expression der ϵ -Untereinheit findet die Kanalkonversion zu einem früheren Zeitpunkt statt als in Wildtyp-Mäusen. Das heißt, dass allein die Verfügbarkeit der entsprechenden Untereinheiten den Rezeptoraustausch bestimmt, der unabhängig von neuronalen Signalen durch muskelspezifische Mechanismen gesteuert wird [4].

Direkte Visualisierung der AChR-Kanalkonversion

In frühen postnatalen Stadien kann man die Abnahme der grün-fluoreszierenden AChR γ GFP und die Zunahme der Rhodamin-Biagarotoxin markierten, rot-fluoreszierenden AChR ϵ in den neuromuskulären Synapsen direkt verfolgen. Die neuen Rezeptoren werden in die peripheren Endplattenbereiche integriert und dann zielgerichtet weiter ins Zentrum transportiert. Dieser Austausch erfolgt nicht gleichmäßig über den ganzen Muskel in allen Endplatten, sondern individuell, Muskelfaser-spezifisch in den einzelnen Endplatten.



AChR γ : AChR ϵ -Kernkonversion während der postnatalen Entwicklung. Der Austausch findet zielgerichtet statt: Neue Rezeptoren werden in der Peripherie integriert und ersetzen dann wahrscheinlich durch laterale Diffusion die zentraler gelegenen synaptischen Rezeptoren. (Skalierung 10 μ m)

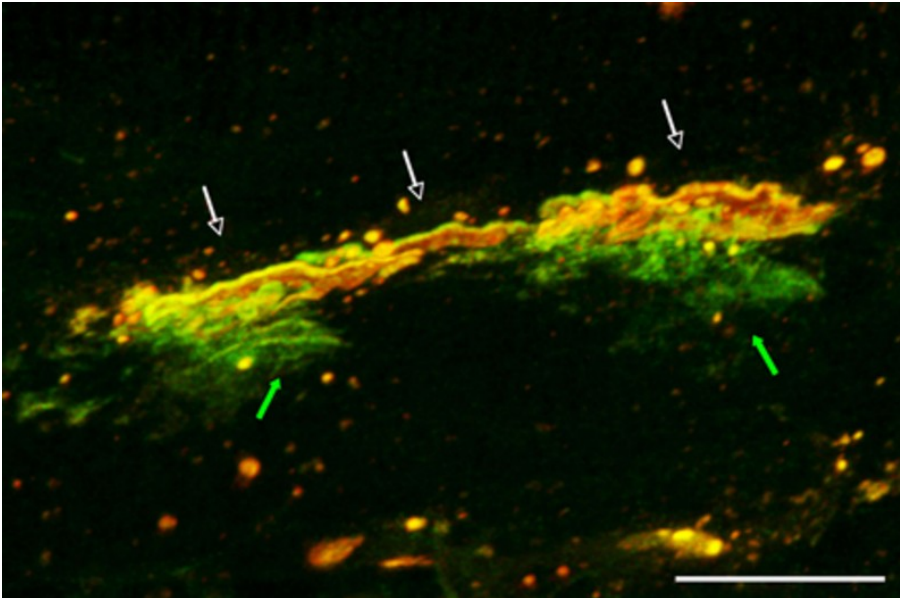
©Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Rezeptorstabilität ist abhängig von Muskelaktivität

Es ist seit langer Zeit bekannt, dass die metabolische Stabilität der Rezeptoren mit der Entwicklung der NMS zunimmt und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 1 Tag auf 10 Tage steigt. Damit wird scheinbar ein Verlust an Plastizität in Kauf genommen. Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass die Stabilisierung nicht statisch ist, sondern auf einem aktivitätsabhängig regulierten AChR recycling-Prozess basiert [5].

Einen experimentellen Ansatz zur Analyse bieten Denervierungsexperimente, in denen die Motoneuronen operativ durchtrennt werden. Die Inaktivierung der Muskeln führt zu einem stark erhöhten metabolischen Umsatz der Rezeptoren. Vor allem die embryonale γ -Untereinheit, die im innervierten adulten Muskel reprimiert ist, wird nun transient wieder sehr stark exprimiert, sodass embryonale Rezeptoren die adulten Rezeptoren in den Endplatten ersetzen. Das legt den Schluss nahe, dass die AChR-Stabilität durch unterschiedlich stabile AChR-Typen bestimmt wird. Paradox erschien die Beobachtung, dass Rezeptordichte und Endplattenstruktur nach Denervierung 10-20 Tage unverändert stabil bleiben sollten, obwohl synaptische Rezeptoren schon 3 Tage nach Denervierung schnelle Umsatzraten zeigten.

Mit den $ACHR_{\gamma}^{GFP/\gamma}^{GFP}$ -Mäusen kann man die Denervierungs-induzierten Veränderungen direkt verfolgen. Wie bei der postnatalen Kanalkonversion sieht man, dass neue Rezeptoren gerichtet in die Synapse eingebaut werden (Abb. 4).



Erplatten zehn Tage nach Denervierung des Soleus-Muskels. Erplatten (weiße Pfeile) enthalten vorwiegend $AChR_{\gamma}^{GFP}$, die die $AChR_{\epsilon}$ ersetzt haben. Die neuen $AChR_{\gamma}^{GFP}$ werden im subsynaptischen sarkoplasmatischen Retikulum zusammengebaut (grüne Pfeile) (Skalierung 20 μm).

©Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Die erhöhte Expression von $AChR_{\gamma}^{GFP}$ ist ungefähr fünfzehn Tage nach der Denervierung wieder stark abgefallen, und alle $AChR_{\gamma}^{GFP}$ sind wieder durch $AChR_{\epsilon}$ ersetzt worden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einbau/Abbau der Rezeptoren und die synaptische Stabilität der Rezeptoren nicht über unterschiedliche Rezeptortypen reguliert oder durch putative neuronale Komponenten beeinflusst wird, sondern in erster Linie vom Angebot an neu synthetisierten Rezeptoren abhängt. Das heißt, Muskeln stellen ein Gleichgewicht (Synthese/synaptische Stabilität/Abbau) her, das die $AChR$ -Dichte an Synapsen regelt. Dieses Gleichgewicht ist muskelspezifisch und hängt von Aktivitätszustand, bzw. Innervierungszustand ab.

Inzwischen wurde eine neue *In-vivo*-Analysemethode entwickelt, mit der es möglich ist, Prozesse wie die Kanalkonversion und Veränderungen der metabolischen Stabilität im Muskel über bis zu 8 Stunden direkt zu verfolgen. Damit kann die Dynamik der Acetylcholinrezeptoren in den neuromuskulären Synapsen mit einer bisher nicht erreichten Auflösung untersucht werden.

Literaturhinweise

- [1] M. Mishina, T. Takai, K. Imoto, M. Noda, T. Takahashi, S. Numa, C. Malfessel, B. Sakmann: Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406-411 (1986).

- [2] H. Schwarz, G. Giese, H. Müller, M. Koenen, V. Witzemann:
Different functions of fetal and adult AChR subtypes for the formation and maintenance of neuromuscular synapses revealed in epsilon-subunit-deficient mice.
European Journal of Neuroscience 12, 3107-3116 (2000).
- [3] M. Koenen, C. Peter, A. Villarroel, V. Witzemann, B. Sakram:
Acetylcholine receptor channel subtype directs the innervation pattern of skeletal muscle.
EMBO Reports 6, 570-576 (2005).
- [4] P. Yampolsky, S. Gensler, J. Mardle, V. Witzemann:
AChR channel conversion and AChR-adjusted neuronal survival during embryonic development.
Molecular and Cellular Neurosciences 37, 634-645 (2008).
- [5] M. Akaboune, S.M. Culican, S.G. Turney, J.W. Lichtman:
Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo.
Science 286, 503-507 (1999).