

Urs Stöcker¹, Ivo A. Telley², Jachen Denoth¹

¹ ETH Zürich, Institut für Biomechanik, Zürich, Schweiz

² EMBL, Cell Biology & Biophysics, Heidelberg, Deutschland

Inhomogenität von Halb-Sarkomer-Längen beeinflusst die Krafterzeugung in Myofibrillen

Welchen Einfluss hat die biologische Variabilität der Halb-Sarkomere auf das Verhalten von Myofibrillen?

Zusammenfassung

Es ist weitgehend akzeptiert, dass eine biologische Variabilität in den Proteinstrukturen von Myofibrillen vorliegt. Diese Annahme impliziert insbesondere eine Inhomogenität im Inneren jeder funktionellen Einheit, des Halb-Sarkomers, dessen mechanische Eigenschaften dadurch massgeblich bestimmt werden. Inhomogenitäten äussern sich folglich in der individuellen Dynamik der Halb-Sarkomere. Die unterschiedliche Dynamik wird in Experimenten an Myofibrillen ersichtlich, wo verschiedene Halb-Sarkomer-Längen beobachtet werden können. Hier präsentieren wir ein mechanisches Modell, das diese Inhomogenität integriert und mit der Kinetik des Actomyosin-Motors in Verbindung bringt. Die an Experimente angelehnten Simulationen ergeben genaue Berechnungen des Verhaltens der Halb-Sarkomere und der Kraftantwort während der Aktivierung. Die Dynamik ist vor allem während der initialen Phase der Aktivierung dominant und beeinflusst den Kraftanstieg. Durch die Steifigkeit der Fixierung der Myofibrille in der experimentellen Vorrichtung kann die Dynamik der Halb-Sarkomere und somit die Kraftanstiegsrate beeinflusst werden. Die Steifigkeit der Fixierung beeinflusst auch die Auffächerung der Längen der Halb-Sarkomere, die für die sequenzielle Relaxation entscheidend ist. Das Verhalten eines einzelnen Halb-Sarkomers während einer längengesteuerten Aktivierung ist abhängig von der Bewegung der anderen Halb-Sarkomere in derselben Myofibrille, und somit kann das Kraftbild nur bedingt mit den biochemischen Reaktionen im Halb-Sarkomer verknüpft werden.

Abstract

It is widely accepted that a biological variability of the protein structures in myofibrils is present. Moreover, it implies an inhomogeneity in the functional unit, the half-sarcomere. It is an important parameter for the force producing characteristics of the half-sarcomere. Thus, one can expect inhomogeneity being unveiled in the individual dynamics of half-sarcomeres. This dynamics can be observed in experiments on myofibrils, where individual half-sarcomere lengths can be visualized. Here we present a mechanical model that integrates this inhomogeneity and couples it with the kinetics of the actomyosin-motor. The simulations, which are based on the experimental findings, give exact insights about the behaviour of the half-sarcomeres and the force-response during activation. The dynamics is mainly present during the initial phase of the activation and influences the development of the force. Due to the stiffness of the fixation of the myofibril in the experimental apparatus the dynamics of the half-sarcomeres can be influenced and hence the activation rate of the force. The stiffness of the fixation also affects the spreading of the lengths of the half-sarcomeres, which is crucial for the sequential relaxation. The behaviour of an individual half-sarcomere during an end-held contraction is dependent on the dynamics of the other half-sarcomeres in the same myofibril and, hence, the appearance of the force can only be related conditionally to the biochemical reactions in half-sarcomeres.

Schweizerische Zeitschrift für «Sportmedizin und Sporttraumatologie» 56 (2), 88–94, 2008

Einführung

Muskelforschung wird seit über hundert Jahren betrieben und sie lässt auch in der heutigen Zeit noch Fragen offen. Vor 70 Jahren war das Ziel, die Bewegung eines ganzen Muskels zu untersuchen und zu beschreiben (Hill, 1938). Das Ziel der heutigen Forschung ist es, die molekularen Ursachen der Muskelkontraktion zu bestimmen und in Modellen zu beschreiben. Hierzu dienen einerseits Experimente an isolierten Einzelmolekülen (molekulare Motoren), andererseits auch Experimente an Myofibrillen und Muskelfasern. Heutzutage ist es technisch möglich, die Z-Scheibe und das M-Band eines Sarkomers zu markieren und diese Markierungen im Mikroskop während der Aktivierung und Relaxation zu verfolgen (Stehle et al., 2002a; Telley et al., 2006a; Telley et al., 2006b).

Die Arbeiten von Telley et al. (2006a,b) zeigen zum ersten Mal die quantitative Auswertung der Dynamik von Halb-Sarkomeren in Myofibrillen sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Relaxation und bei moderat schnellen Dehnungen. Telley et

al. (2006a) zeigen, dass sich die Halb-Sarkomere scheinbar unabhängig voneinander bewegen, obwohl sie in Serie geschaltet sind. Das Halb-Sarkomer bildet die kleinste funktionelle Einheit eines Muskels. Die Versuche zeigen weiter, dass die Verteilung der Halb-Sarkomer-Längen während der Aktivierung und Relaxation sehr inhomogen ist. Diese experimentellen Resultate bieten die Basis für theoretische Betrachtungen, die in dem vorliegenden Artikel ausgeführt werden. Die Erkenntnisse über die Inhomogenität der Halb-Sarkomer-Längen während unterschiedlicher experimenteller Protokolle können dann – unter bestimmten Voraussetzungen – auf Muskelfasern übertragen werden. Möglicherweise kann die Frage beantwortet werden, was in einer Faser strukturell und biochemisch auf Sarkomerebene geschieht, wenn verschiedene Kontraktionsformen vorherrschen, wie dies beispielsweise während eines Krafttrainings der Fall ist. Auch die biophysikalische Funktion des Herzmuskels – insbesondere das Verhalten bei Aktivierung und Relaxation – kann mit diesen Experimenten besser untersucht werden, in der Hoffnung, ein besseres Verständnis zu gewinnen.

Nur ein theoretisches Modell, das die Kinetik der Querbrücken der Halb-Sarkomere und die Mehrsegment-Struktur der Myofibrillen verbindet, kann die Experimente an Myofibrillen von Telley et al. (2006a,b) theoretisch beschreiben und analysieren. Ein solches Modell wurde kürzlich von uns eingeführt und besprochen (Stöcker et al., 2008). Es ist schwierig, die biologischen Vorstellungen der Strukturen in ein mechanisches Bild zu bringen und damit zu rechnen. Die biologische Variabilität der Proteinstrukturen wird in existierenden Modellen meist vernachlässigt, obschon sie der Hauptgrund für das individuelle Verhalten der einzelnen Halb-Sarkomere zu sein scheint. Hingegen wird die Kinetik der Motorproteine (Actin-Myosin) in aktuellen Modellen ausführlich beschrieben (z.B. Piazzesi und Lombardi, 1996).

In einzelnen Publikationen wurde auf die Wichtigkeit der biologischen Variabilität und die damit einhergehende Inhomogenität der Sarkomerlängen hingewiesen (z.B. Sugi und Tsuchiya, 1998; Telley et al., 2003). Diese unterschiedlichen Längen beeinflussen die Dynamik der Sarkomere und somit den Kraftverlauf während der Aktivierung, der Relaxation und auch während der Dehnung einer Myofibrille. Das oben erwähnte Mehrsegment-Modell wird in der vorliegenden Arbeit kurz skizziert und das typische Verhalten anhand von Simulationen gezeigt. Ein Beispiel ist der Einfluss der Sarkomerdynamik auf die Kraftanstiegsrate während einer Aktivierung.

Die Mehrsegment-Struktur einer Myofibrille wird im Modell von Denoth et al. (2002) theoretisch analysiert und simuliert. In diesem Modell wird die Kinetik durch die Hill'sche Kraft-Geschwindigkeits-Relation beschrieben, die im Allgemeinen nur für stationäre Zustände der Querbrücken-Kinetik herbeigezogen werden kann. Daher muss das Modell von Denoth et al. (2002) für Aktivierungen, Relaxation und Stretch einer Myofibrille mit einer transienten Querbrücken-Kinetik erweitert werden.

Grundlagen

Dynamik von Halb-Sarkomeren in Experimenten

Erst seit wenigen Jahren ist es möglich, einzelne Strukturen eines Sarkomers zu markieren und so grob die Sarkomerbewegungen aufzulösen (Stehle et al., 2002a; Tesi et al., 2002; Poggesi et al., 2005). Telley et al. (2006a) studierten diese Bewegungen während einer Ca^{2+} -Aktivierung und Relaxation einer Myofibrille. Sie untersuchten den Psoas des Hasen und den linksseitigen Ventrikel des Meerschweinchens, dessen Z-Linie und M-Band mit fluoreszierenden Antikörpern markiert wurde (siehe Abb. 1). Die Markierungen wurden mittels Videomikroskopie erfasst und anschließend mit einem speziellen «Tracking»-Algorithmus ausgewertet. Die Verschiebung der Markierungen konnte auf eine Genauigkeit von etwa 10 Nanometer aufgelöst werden. Die Myofibrillen wurden in einer physiologischen Lösung mit einer Temperatur von 10 °C und einem pH von 7.0 untersucht.

Die Längenänderungen der Halb-Sarkomere während der Aktivierung sind sehr inhomogen, und es ist eine deutliche Verkürzung der Halb-Sarkomere zu erkennen, auch wenn im Experiment die äussere Länge zwischen Kraftsensor und Fixierung konstant gehalten wird. Diese Bewegung der Halb-Sarkomere kommt einerseits durch die Elastizität der Fixierung und des Kraftsensors, andererseits auch durch «tote» Halb-Sarkomere zustande. Als «tote» Halb-Sarkomere bezeichnen wir Halb-Sarkomere, die keine aktive Kraft mehr erzeugen können. Solche «tote» Halb-Sarkomere treten vor allem am Rand der Myofibrille auf, da sie während der Fixierung der Myofibrille in die experimentelle Vorrichtung beschädigt wurden.

Die Auffächerung der Längen beginnt grundsätzlich in der ersten Millisekunde der Aktivierung und nimmt im weiteren Verlauf zu (Abb. 2). Die erste Sekunde der Aktivierung ist die Zeit des Kraftaufbaus. Nach einer Aktivierung von 1 s ist ein Kraftplateau erreicht. Die Relaxation einer kardialen Myofibrille nach der Deaktivierung geschieht zeitlich und örtlich ausgeprägt sequenziell, das heisst, die benachbarten Halb-Sarkomere verlängern sich



Abbildung 1: Markierte Myofibrille mit 10 Halb-Sarkomeren. Die Myofibrille wurde mit fluoreszierenden Antikörpern in der Z-Linie (weisse Kreuze) und dem M-Band (grau) markiert, so dass die Bewegungen mittels Videomikroskopie ausgewertet werden konnten. [Aus Daten von Telley et al., 2006a.]

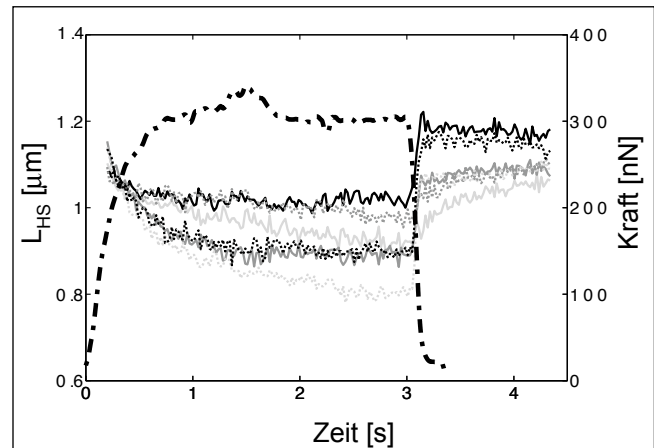


Abbildung 2: Kontraktion und Relaxation einer Myofibrille. Die fette strichpunktiierte schwarze Linie zeigt die Kraft einer durch Ca^{2+} aktivierten Myofibrille vom Psoas des Hasen. Die Aktivierung beginnt bei 0 s und dauert 3 s. Der Ausschlag nach dem Aufbau der Kraft bei 1.5 s ist ein Artefakt der Messapparatur. Die dünnen Linien bezeichnen die Längen der Halb-Sarkomere während der Aktivierung und der Relaxation. Die Inhomogenität der Längen wird in der ersten Sekunde des Kraftaufbaus aufgestellt und ändert sich nachher nur noch geringfügig. Obwohl die Relaxation sehr schnell geschieht, sieht man eine sequenzielle Verlängerung der Halb-Sarkomere. [Modifiziert nach Telley et al., 2006.]

nacheinander. Die Relaxation beginnt mit dem längsten Halb-Sarkomer, um sich dann nach links oder rechts fortzupflanzen. Wird die Bewegung der Halb-Sarkomere während der Aktivierung und der Relaxation betrachtet, so scheinen diese unabhängig voneinander. In «Tat und Wahrheit» ist die Dynamik nicht unabhängig – jedes Halb-Sarkomer muss die gleiche Kraft erzeugen! Die Beobachtung lässt auch den Schluss zu, dass, obwohl das Sarkomer die strukturelle Einheit ist, das Halb-Sarkomer die Rolle der funktionellen Einheit einer Myofibrille übernimmt. Interessanterweise ist die Transferzeit bei der Relaxation zwischen zwei durch eine Z-Scheibe getrennten Halb-Sarkomeren länger als zwischen zwei Halb-Sarkomeren, die im selben Sarkomer liegen. Dies lässt darauf schliessen, dass die Relaxation über die mechanischen Strukturen fortgepflanzt wird, möglicherweise indem durch den Kraftabfall der Abstand zwischen dem Actin- und dem Myosinfilament abnimmt. Die Z-Linie ist in transversaler Richtung steifer als das M-Band und beeinflusst durch diese Mechanik die Transferzeiten der Relaxation. Diese Idee wurde in einem Übersichtsartikel der Autoren noch weiter ausgeführt und diskutiert (Telley und Denoth, 2007).

In einem weiteren Experiment untersuchten Telley et al. (2006b) das Verhalten der Halb-Sarkomere während und nach einer Dehnung (Stretch) der Myofibrille des Psoas des Hasen. Die Autoren sahen während und nach dem Stretch komplexe Bewegungen der Halb-Sarkomere: kurze Halb-Sarkomere verkürzten oder verlängerten sich noch weiter; längere Halb-Sarkomere verkürzten sich wieder, um zurück in den Bereich der optimalen Länge zu kommen. Somit erhöht sich die Inhomogenität der Sarkomerlängen während und nach dem Stretch. Die Halb-Sarkomer-Längen verändern sich nach dem Stretch sehr langsam. Diese langsame Dynamik nach einem Stretch kann auch in Simulationen eines

vereinfachten Mehrsegmentmodells von Myofibrillen beobachtet werden (Telley et al., 2003). Obwohl im Experiment die Längen der schwachen Halb-Sarkomere so weit auseinandergezogen wurden, dass das Aktinfilament nicht mehr optimal mit dem Myosinfilament überlagert war, sahen die Autoren kein sogenanntes «Sarkomer-Popping», das heisst keine sehr schnellen Dehnungen einzelner Sarkomere. Ein «Sarkomer-Popping» wurde von Talbot und Morgan (1996) vorhergesagt für den Fall, in dem die sehr langen Halb-Sarkomere schnell verlängern, um dann in den passiven Strukturen (Titin) aufgefangen zu werden. Weiter konnten Telley et al. zeigen, dass eine mögliche Rolle der Dynamik der Halb-Sarkomere in dem Phänomen einer verbleibenden Krafterhöhung nach einer Dehnung eines aktivierten Muskels existiert. Dieses Phänomen wurde in den letzten Jahren häufig untersucht und ist noch nicht restlos geklärt (Rassier und Herzog, 2004). Der Erklärungsansatz von Telley et al. (2006b) besteht darin, dass starke Halb-Sarkomere durch den Stretch wieder in die optimale Länge gezogen werden, die sie nach der Aktivierung verlassen haben. So können sie mehr Kraft erzeugen als vor dem Stretch und bilden somit einen Teil dieser verbleibenden Kraft.

Grundsätzlich bemerken Telley et al. (2006b), dass die Inhomogenität der Halb-Sarkomer-Längen nach der Aktivierung grösser ist als die Länge des Plateaus ($0.2 \mu\text{m}$) der Kraft-Längen-Relation eines Hasen-Psoas. Dieses Plateau erstreckt sich von $1.0 \mu\text{m}$ bis $1.2 \mu\text{m}$. Nach der Aktivierung existieren kurze ($\sim 0.9 \mu\text{m}$) und lange ($\sim 1.5 \mu\text{m}$) Halb-Sarkomere zusammen in einer Myofibrille, die zu diesem Zeitpunkt ihre maximale Kraft generiert. Somit sind Voraussagen über Populationen von Halb-Sarkomeren auf der Basis der Kraft-Längen-Relation einer ganzen Faser nicht sinnvoll. Eine Muskelfaser kann verschiedene Halb-Sarkomer-Längen ausserhalb des Plateaus beinhalten, obwohl die Faserlänge von aussen gesehen im Bereich der optimalen Länge ist.

Theoretische Beschreibung einer Myofibrille

Aus mechanischer Sicht ist eine Myofibrille eine Kette von kleinen Motoren. Die kleinste funktionelle Einheit dieser seriellen Struktur ist das Halb-Sarkomer, das aus zwei parallelen Strängen besteht (Telley et al., 2003): Ein Strang repräsentiert die passive Komponente (paralleles Element PE) des Titins; der andere Strang repräsentiert die aktive Einheit des Actin-Myosin-Motors (siehe Abb. 3). Der Actin-Myosin-Motor seinerseits besteht aus zwei seriellen Elementen: eine serielle Elastizität (serielles Element SE) der Z-Linie, der Actin- und Myosinfilamente, sowie ein kontraktiles Element («contractile Element» CE).

Die Kontraktilität eines Halb-Sarkomers ist gegeben durch die ATP-Hydrolyse im kontraktilen Element, die von der Ca^{2+} -Aktivierung der dünnen Filamente (Actin) abhängt. Das kontraktile Element erzeugt seine Kraft durch die Interaktion von Myosin mit dem Actin. Die dabei entstehenden Querbrücken («crossbridges» CB) haben verschiedene Zustände, die durch ihre räumliche Konfiguration verschiedene Kräfte erzeugen. Diese Zustände werden in einem biochemischen Zyklus durchlaufen, wobei die Übergangsraten von einem Zustand in den nächsten von dem chemischen und mechanischen Potenzial abhängen. Das Modell von Huxley (1957) ist die einfachste mathematische Beschreibung des Zyklus dieser Zustände und der daraus resultierenden Kraftentwicklung. Huxley postulierte einen gebundenen und einen ungebundenen Zustand sowie asymmetrische Bindungs- und Entkopplungsraten $f(x,t)$ und $g(x)$, die von der Auslenkung x der Querbrücke und dem Zeitpunkt t der Aktivierung abhängen. Er fasste die gebundenen Zustände zusammen und beschrieb sie in einer Verteilung $n(x,t)$, die vom Ort der Auslenkung der Querbrücken und der Zeit abhängt. Diese Verteilung unterliegt einem stetigen Auf- und Abbau durch die Kopplung und Entkopplung der Querbrücken, sodass sie durch eine partielle Differentialgleichung (Gleichung 1) beschrieben werden kann, die von der Längenänderung des kontraktilen Elementes pro Zeiteinheit, der Geschwindigkeit $\dot{u}(t)$ abhängt. Charakterisiert man die Querbrücken (CB) als elastische Federn, die eine von der Auslenkung x abhängige Kraft $f_{CB}(x)$ er-

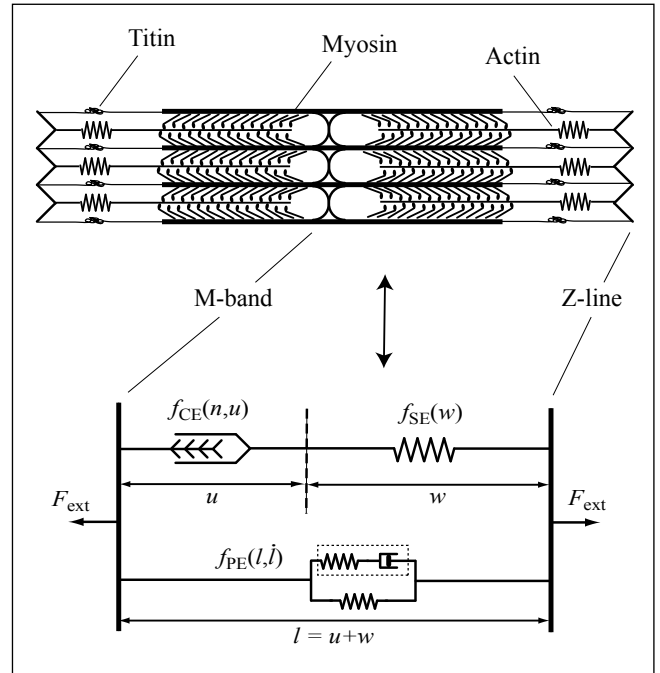


Abbildung 3: Mechanisches Modell. Interpretation der ausgezeichneten biologischen Strukturen eines Halb-Sarkomers (oben) in ein mechanisches Modell (unten). Wir definieren die Z-Linie und das M-Band als die strukturellen Grenzen eines Halb-Sarkomers. Das kontraktile Element (CE) generiert die Kraft $f_{CE}(n,u)$ mittels der ATP-Hydrolyse. Das serielle Element (SE) beschreibt die Elastizität der Myosin- und Actinproteine sowie des M-Bandes und der Z-Scheibe und erzeugt eine rein elastische Kraft der Form $f_{SE}(w)$. Das parallele Element (PE) besteht aus dem passiven Titin, das verhindert, dass die Myofibrille auseinandergerissen wird. Das Titin ist ein visko-elastisches Element, das eine Kraft der Form $f_{PE}(l,l)$ bilden kann.

zeugen, so kann man die Kraft des kontraktilen Elementes f_{CE} bis auf einen Normierungsfaktor C_{norm} mittels Integration berechnen (siehe Gleichung 1). In diesem Normierungsfaktor kann die Anzahl der möglichen Querbrücken integriert werden. Diese Anzahl hängt sowohl von der biologischen Variabilität der Gesamtzahl der Myosinköpfe in einem Halb-Sarkomer als auch von der Überlappung der Actin- und Myosinfilamente ab (Stöcker et al., 2008). Der biologischen Variabilität der Anzahl der Myosinköpfe wird mittels eines normalverteilten Proportionalitätsfaktors – der Kraftkapazität – Rechnung getragen. Die Überlappungslänge der Filamente hängt von der Länge des kontraktilen Elementes $u(t)$ ab. Bei einem optimalen Überlapp zwischen Actin- und Myosinfilament können alle Myosinköpfe Bindungen mit dem Actinfilament eingehen. Wird dieser Längenbereich unter- oder überschritten, können die Myosinköpfe in der Filamentmitte bzw. am Filamentende keine Bindungen mehr eingehen und die maximale kontraktile Kraft wird reduziert.

$$\frac{\partial n(x,t)}{\partial t} \Big|_x + \dot{u}(t) \frac{\partial n(x,t)}{\partial x} \Big|_t = f(x,t) - [f(x,t) + g(x)]n(x,t) \quad (\text{Gl. 1})$$

$$f_{CE}(n,u) = C_{norm}(u) \int_{IR} n(x,t) f_{CB}(x) dx$$

Definieren wir die Länge des seriellen Elementes als $w(t)$, können wir die Länge des Halb-Sarkomers $l(t) = w(t) + u(t)$ berechnen. Das parallele Element (PE) und das serielle Element (SE) können durch nichtlineare visko-elastische Funktionen der Form $f_{PE}(l,\dot{l})$ und $f_{SE}(w)$ beschrieben werden. Aus mechanischen Überlegungen infolge der Anordnungen der Elemente ergeben sich dann Kraftbeziehungen für jedes Halb-Sarkomer mit der Nebenbedingung, dass die Länge des Halb-Sarkomers aus den Längen des kontraktilen und des seriellen Elementes besteht (Gleichung 2).

$$\begin{aligned}
 F_{HS}(n, u, l, \dot{l}) &= f_{CE}(n, u) + f_{PE}(l, \dot{l}) \\
 &= f_{SE}(w) + f_{PE}(l, \dot{l}) \\
 l &= u + w
 \end{aligned}
 \quad (\text{Gl. 2})$$

In einer seriellen Anordnung von Motoren muss nach dem Newton'schen Prinzip von «actio» und «reactio» die Kraft jedes Halb-Sarkomers gleich sein. In den Experimenten an Myofibrillen existieren kraft- und längengesteuerte Regelungen. Bei der kraftgesteuerten Regelung wird die Kraft der Myofibrille vorgegeben und die totale Länge gemessen. Bei der längengesteuerten Regelung wird die äussere Länge vorgegeben und die Kraft gemessen. Der kraftgesteuerte Fall ist mathematisch einfacher zu beschreiben als der längengesteuerte Fall, da im längengesteuerten Fall die Längen der einzelnen Halb-Sarkomere voneinander abhängen. Die Myofibrille hängt in Experimenten zwischen einem Kraftsensor und einer Fixierung. Nimmt man die Fixierung und den Kraftsensor als lineare Feder an, so erhält man eine externe Kraft $F_{ext} = k_{ext}\Delta x_{ext}$, wobei Δx_{ext} die Auslenkung der Feder ist. Somit gilt für jedes Halb-Sarkomer $F_{HS} = F_{ext}$. Für längengesteuerte Versuche hängt die Auslenkung der externen Feder von den Längen der N Sarkomere

in der Myofibrille ab ($\Delta x_{ext} = L_{tot} - \sum_{i=1}^N l_i$), und die Längen der

Halb-Sarkomere sind somit voneinander abhängig. Die hier eingeführte externe Feder wird im weiteren Verlauf dieser Publikation generell als Fixierung aufgefasst, wobei darin die Elastizität des Kraftsensors, die Elastizität der Fixierung der Myofibrille sowie die Elastizität der toten Halb-Sarkomere enthalten sind.

Um das zeitliche Verhalten der Länge eines Halb-Sarkomers zu beschreiben, leitet man die Gleichung 2 nach der Zeit ab und bildet ein Differenzialgleichungssystem, das aus den kinetischen Gleichungen von Huxley und aus den mechanischen Bewegungsgleichungen für jedes Halb-Sarkomer besteht. Mittels dieser Gleichungen kann man das allgemeine Verhalten einer Myofibrille simulieren. In dieser Arbeit beschränken wir uns auf die Untersuchung der Dynamik der Halb-Sarkomere während der Aktivierung. Eine detaillierte Beschreibung des Formalismus und die Herleitung der Gleichungen finden sich in Stöcker et al. (2008).

Parameterwahl der Simulationen von Myofibrillen

Die Parameter der Funktionen des parallelen und seriellen Elementes wurden nach strukturellen Daten in der Literatur für einen

Psoas-Muskel des Hasen abgeglichen (Kellermayer et al., 1997; Linke, 2000; Minajeva et al., 2002; Higuchi et al., 1995). Für die Berechnung der Kraft des kontraktile Elementes wurden die Bindungsraten $f(x, t)$ und $g(x)$ von Huxley so abgestimmt, dass für ein gleichmässig verkürzendes Halb-Sarkomer mit einer mittleren Kraftkapazität die Kraft-Geschwindigkeits-Kurve eines Hasen-Psoas (Sun et al., 2001) rechnerisch wiedergegeben werden konnte. Der mittlere Normierungsfaktor C_{norm} bei optimalem Überlapp der Filamente wurde gemäss strukturellen Daten aus der Literatur berechnet (Ebashi et al., 1969; Linari et al., 2007) und mit der Kraft-Längen-Relation (Edman, 2005) multipliziert. Die biologische Variabilität wurde als Kraftkapazität im Normierungsfaktor C_{norm} für jedes Halb-Sarkomer integriert. Die dimensionslosen Kraftkapazitäten wurden normalverteilt angenommen, wobei die Standardabweichung dieser Normalverteilung in den Simulationen auf $\sigma = 0.10$ gesetzt wurde, was in etwa den Beobachtungen in den Experimenten von Telley et al. (2006a) entspricht. Die Kraft eines Halb-Sarkomers wurde mit der isometrischen Kraft F_0 eines im Mittel der biologischen Variabilität liegenden Halb-Sarkomers normiert.

Wir simulierten eine aus acht Halb-Sarkomeren bestehende Myofibrille, die an eine externe Feder der Steifigkeit k_{ext} gekoppelt ist. Dieses Myofibrillen-Modell wurde während 3 s aktiviert (Abb. 4). Eine weiche externe Feder mit $k_{ext} = 5 F_0/\mu\text{m}$ entspricht annähernd der externen Elastizität bei üblichen Experimenten an Myofibrillen, wobei der Kraftsensor sowie die toten Halb-Sarkomere etwa eine Steifigkeit von je $10 F_0/\mu\text{m}$ haben (Telley et al., 2006a). Die harte Feder $k_{ext} = 30 F_0/\mu\text{m}$ entspricht den Experimenten, in denen ein Längensegment (mehrere Dutzend Halb-Sarkomere) innerhalb einer Faser mittels einer Steuerung der externen Länge konstant gehalten wird (Gordon et al., 1966; Edman, 2005).

Resultate

Aktivierung einer Myofibrille

Mit dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Modell simulierten wir die Aktivierung von Myofibrillen gemäss den Versuchen von Telley et al. (2006a). Dabei wurde die Länge des Systems (Länge der Myofibrille plus Auslenkung der Fixierung) geregelt und konstant gehalten (konstantes L_{tot}). Wie in den Experimenten baut sich in den Simulationen die Inhomogenität der Halb-Sarkomere während der ersten Sekunde der Aktivierung auf (Abb. 4). Danach verkürzen sich die Halb-Sarkomere mit einer annähernd

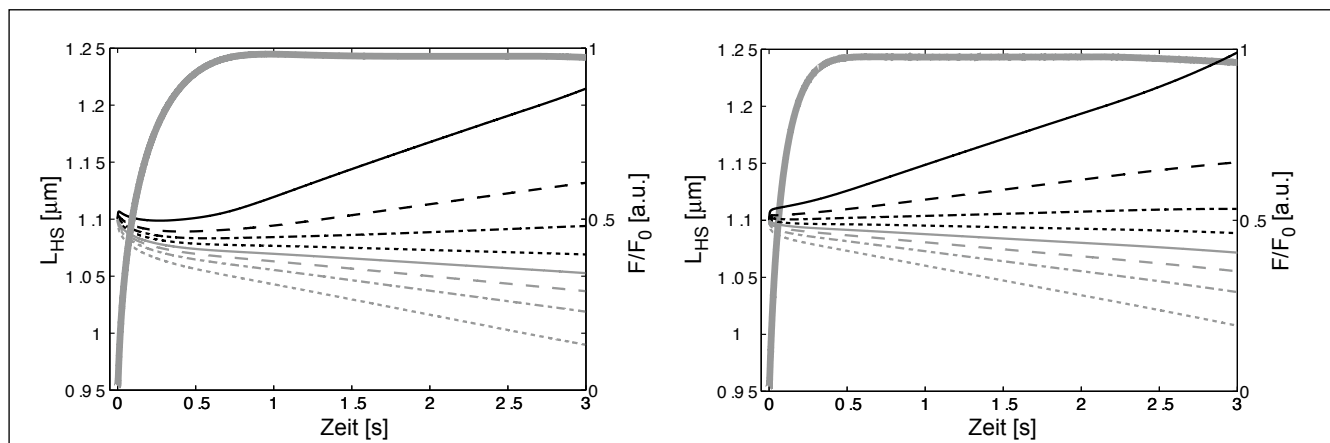


Abbildung 4: Simulation der Aktivierung einer Myofibrille mit acht Halb-Sarkomeren. Eine aus acht Halb-Sarkomeren bestehende Myofibrille wurde wie im Experiment von Telley et al. (Abb. 2) aktiviert (links: $k_{ext} = 5 F_0/\mu\text{m}$, rechts: $k_{ext} = 30 F_0/\mu\text{m}$), wobei die Länge des Systems (Myofibrille und Fixierung) konstant gehalten wurde. Der Kraftverlauf der Myofibrille ist als dicke graue Linie dargestellt, die Längen der Halb-Sarkomere als dünne Linien. Je steifer die externe Feder (grösseres k_{ext}), desto weniger mittlere Bewegungsfreiheit haben die Halb-Sarkomere und somit verkürzen sie weniger. Die grösste Dynamik der Halb-Sarkomere geschieht in den ersten Zehntelsekunden der Aktivierung, danach bewegen sich die Halb-Sarkomere gleichmässig und vergrössern durch die Auffächerung ihre Inhomogenität. Die Dynamik in der initialen Phase der Aktivierung beeinflusst den Kraftanstieg, die Auffächerung legt den Grundstein für die darauf folgende sequenzielle Relaxation, wo das jeweils längste aktive Halb-Sarkomer sich zu verlängern beginnt, bis es in den passiven Strukturen hängen bleibt.

konstanten Geschwindigkeit und fächern sich weiter auf. In den Simulationen ist die initiale Verkürzung der Halb-Sarkomere weniger gross als im Experiment. Hingegen ist die Auffächerung der Längen am Ende der Aktivierung der Simulation vergleichbar mit den experimentellen Daten. Dies hat insbesondere damit zu tun, dass die Elastizität an den Enden der Myofibrille durch «tote» Halb-Sarkomere in der Simulation unterschätzt wurde.

Kraftanstieg bei Aktivierung

Die Bewegungsfreiheit eines Halb-Sarkomers setzt sich aus der mittleren Bewegung aller Halb-Sarkomere und aus der relativen Bewegung zwischen den Halb-Sarkomeren zusammen. Die mittlere Bewegung aller Halb-Sarkomere ist gegeben durch die Flexibilität der äusseren Fixierung. Die relative Bewegung ist gegeben durch die Unterschiede in den individuellen Kapazitäten der Kraft. Je grösser die externe Steifigkeit ist, desto weniger Bewegungsfreiheit haben die Halb-Sarkomere und umso weniger können sie im Mittel initial verkürzt werden (Abb. 5B). Verkürzen sich die Halb-Sarkomere, können sie weniger Kraft erzeugen. Diese Dynamik in der initialen Phase der Aktivierung beeinflusst dementsprechend den Kraftaufbau (Abb. 5A). Dieser Kraftaufbau wird am besten durch die in der Muskelforschung gängige Kraftanstiegsrate k_{act} beschrieben (Stehle et al., 2002b), die sich durch die optimale Anpassung des theoretischen Kraftanstiegs der Form $F(t) = (F_{max} - F_{min})(1 - e^{-k_{act}(t-t_{act})}) + F_{min}$ an die experimentellen oder simulierten Daten berechnet. Je grösser die Kraftanstiegsrate k_{act} , desto steiler

ist die Kraftkurve zu Beginn der Aktivierung. Wird die Steifigkeit der externen Feder k_{ext} erhöht und damit der Spielraum der Bewegungen der Halb-Sarkomere verkleinert, so erhöht sich die Rate des Kraftanstiegs (Abb. 6). Diese nichtlineare Zunahme von k_{act} flacht schnell ab und wird für grosse Steifigkeiten linear. Diesen Effekt haben auch Telley et al. (2007) mit einem vereinfachten Modell beschrieben.

Auffächerung bei Aktivierung

Die Dynamik der Halb-Sarkomere zeigt sich nicht nur in der initialen Verkürzung sondern auch in der folgenden Auffächerung der Halb-Sarkomer-Längen. Die Auffächerung ist der Abstand zwischen dem stärksten und dem schwächsten Halb-Sarkomer ($l_{schwach} - l_{stark}$) und ist ein Mass für die Inhomogenität der Halb-Sarkomer-Längen. Die Dynamik der Halb-Sarkomere kann durch die Summe der gemittelten absoluten Geschwindigkeiten quantifiziert

werden: $v_{dyn} = \sum_{i=1}^N |v_i| / N$. Die Auffächerung nimmt während der

gesamten Aktivierung zu (Abb. 5C). Der Betrag der Auffächerung zum gleichen Zeitpunkt nimmt dagegen nur sehr leicht zu, wenn die äussere Steifigkeit erhöht wird. Hingegen steigt die Kraftanstiegsrate bei grösserer äusserer Steifigkeit, womit ein Kraftplateau schneller erreicht wird. Beim Erreichen eines Kraftplateaus ist die initiale Dynamik grösstenteils abgeschlossen. Die Halb-Sarkomere verkürzen und verlängern sich nach dieser initialen Dynamik

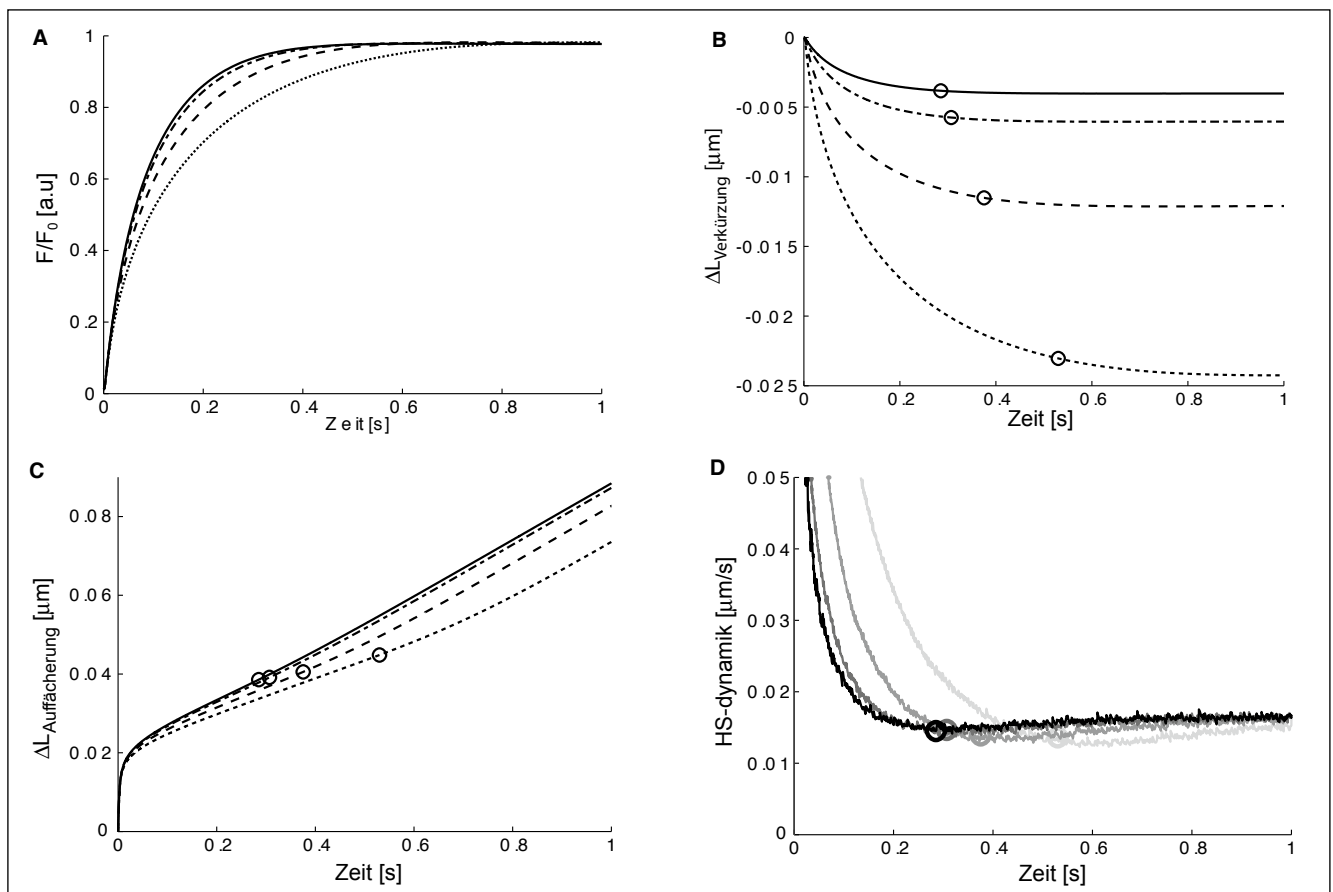


Abbildung 5: Dynamik und Inhomogenität der Halb-Sarkomere bei Aktivierungen. Eine aus acht Halb-Sarkomeren bestehende Myofibrille wurde bei verschiedenen externen Steifigkeiten (punktiert: $k_{ext} = 5 F_0/\mu m$; gestrichelt: $k_{ext} = 10 F_0/\mu m$; strichpunktirt: $k_{ext} = 20 F_0/\mu m$; ausgezogen: $k_{ext} = 30 F_0/\mu m$) während einer Aktivierung simuliert. Die Kreise bezeichnen die Zeitpunkte, bei denen 95% der Kraft erreicht werden. Nach diesen Zeitpunkten ist die initiale Phase der Aktivierung grösstenteils abgeschlossen. A: Der Kraftverlauf in der ersten Sekunde bei den verschiedenen Steifigkeiten. Je steifer die externe Feder, desto schneller ist die maximale Kraft erreicht. B: Die mittlere Verkürzung der Halb-Sarkomere während der Aktivierung. Nach der initialen Phase (Kreise) ist die Verkürzung grösstenteils abgeschlossen. C: Die Auffächerung ($L_{schwach} - L_{stark}$) der Halb-Sarkomere nimmt während der Aktivierung zu. Die grösste Zunahme geschieht in den ersten Hundertstelsekunden, nachher wird sie konstant. Die Auffächerung am Ende der initialen Phase (Kreise) nimmt für stärkere externe Steifigkeiten leicht ab. D: Die Dynamik der Halb-Sarkomere während der Aktivierung. Die Dynamik erreicht für alle Steifigkeiten ein Maximum von ungefähr 1.2 $\mu m/s$ bei 0.5 ms und nimmt nachher exponentiell ab.

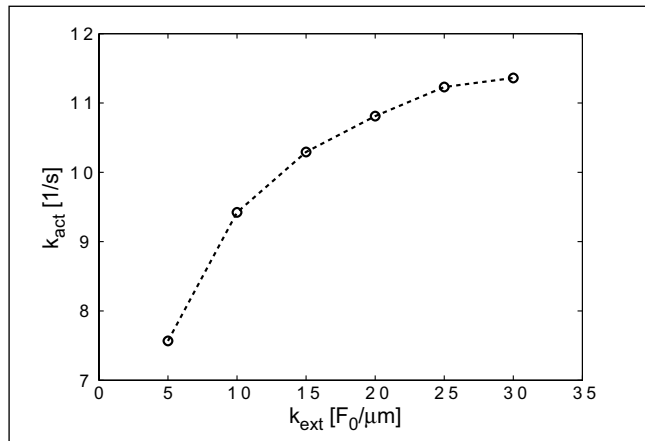


Abbildung 6: Kraftanstiegsrate bei verschiedenen externen Fixierungen. Die Simulation aus Abbildung 4 wurde für verschiedene steife externe Fixierungen (k_{ext}) wiederholt. Diese Steifigkeit der Fixierung hängt einerseits vom experimentellen Aufbau ab und kann andererseits auch von toten Halb-Sarkomeren in der Myofibrille beeinflusst werden. Die Kraftanstiegsrate k_{act} nimmt für steifere externe Fixierungen zu, wobei sie sich für sehr steife Fixierungen nur noch leicht verändert. Die Kraftanstiegsrate wird in der Muskelforschung oft zur Bestimmung der kinetischen Übergangsraten verwendet, die unabhängig von der Dynamik sind.

annähernd konstant, was in einer gleichmässigen Auffächerung resultiert. Interessant ist also der Betrag der Auffächerung am Ende dieser initialen Phase der Dynamik. Zu dem Zeitpunkt, bei dem 95% der maximalen Kraft erreicht wurden, ist diese initiale Dynamik grösstenteils abgeschlossen (Abb. 5D). Betrachtet man die Auffächerung zu diesem Zeitpunkt, so ist sie abhängig von der äusseren Steifigkeit und wird mit zunehmender Steifigkeit kleiner (Abb. 5C).

Die Auffächerung der Halb-Sarkomer-Längen kann so gross werden, dass das stärkste und das schwächste Halb-Sarkomer nicht mehr im Bereich der optimalen Überlappung von Actin- und Myosinfilament sind. Dieser Bereich der optimalen Überlappung ist beim Psoas des Hasen zwischen einer Halb-Sarkomer-Länge von $1.0 \mu m$ und $1.2 \mu m$. Wird die Auffächerung somit zu gross, fällt die Kraft der Myofibrille ab (Abb. 4 links nach ca. 2.5 Sekunden).

Diskussion

Die Dynamik der Halb-Sarkomere ist experimentell gezeigt worden, sodass eine theoretische Beschreibung einer Myofibrille notwendig ist, die diese Erkenntnisse miteinbezieht. Auf der Basis des aktuellen biologischen Wissensstandes können mit einem Modell die Vorstellungen der biologischen Vorgänge durch Simulationen validiert, angepasst und erweitert werden. Bislang existieren Modelle, die die Mehrsegment-Struktur der Myofibrille miteinbeziehen, jedoch Vereinfachungen in der Kinetik machen. Unser hier skizziertes und in Stöcker et al. (2008) ausgeführtes Modell verbindet die Dynamik der Halb-Sarkomere mit der Kinetik des Actomyosin-Motors. Die implementierte Kinetik ist nicht zu komplex, da sie nur einen gebundenen und einen ungebundenen Zustand der Querbrücken zwischen Actin und Myosin beinhaltet. Das präsentierte Modell einer Myofibrille ist sehr allgemein, sodass in einfacher Weise ein komplexeres Modell der Kinetik integriert werden kann. Das Modell von Piazzesi und Lombardi (1996) könnte zum Beispiel ein solches komplexeres Modell sein, da es mehrere gebundene und ungebundene Zustände beinhaltet.

In den längengesteuerten Versuchen wird die Dynamik der Halb-Sarkomere einerseits durch die Variabilität der Kraftkapazitäten und andererseits durch die Steifigkeit der externen Fixierung beeinflusst. Diese Dynamik ist insbesondere in der Anfangsphase gross, in der die Kraft sehr steil ansteigt. Der Kraftanstieg nimmt ab, wenn die mittlere Verkürzung der Halb-Sarkomere durch eine kleinere externe Steifigkeit (k_{ext}) vergrössert wird. Die kleineren

externen Steifigkeiten beeinflussen zwar nicht den maximalen Wert der initialen Dynamik, jedoch verlängern sie die Phase der initialen Dynamik (Abb. 5D) und verzögern damit den Kraftaufbau. Der maximale Wert der initialen Dynamik rührt von der initialen Auffächerung der Halb-Sarkomer-Längen her und ist somit verbunden mit der biologischen Variabilität. In der Muskelforschung wird die Kraftanstiegsrate k_{act} als ein experimentell bestimmter Parameter herbeigezogen, um daraus die kinetischen Übergangsraten f und g des Huxley-Modells zu berechnen. Dabei wird implizit angenommen, dass eine vernachlässigbare biologische Variabilität auftritt und eine unendlich steife Fixierung existiert, was eine Dynamik verschwinden lässt. Durch die Simulationen kann gezeigt werden, dass die Dynamik der Halb-Sarkomere in realen Myofibrillen stets existiert und einen Einfluss auf die Bestimmung dieser Übergangsraten hat. Somit müssen prinzipiell andere Experimente zur Bestimmung von f und g vorgeschlagen werden. Eine Möglichkeit wäre, die Länge eines einzelnen Halb-Sarkomers über eine Regelung konstant zu halten und somit den Kraftanstieg dieses Halb-Sarkomers zu messen.

Ein Mass der Inhomogenität der Halb-Sarkomer-Längen ist die Auffächerung der Halb-Sarkomer-Längen. Die Inhomogenität nach der initialen Phase nimmt mit grösserer äusserer Steifigkeit ab. Somit sind die Inhomogenitäten in Experimenten, in denen ein Längensegment der Faser konstant gehalten wurde ($k_{ext} \sim 30 F_0/\mu m$), kleiner als in üblichen Experimenten an Myofibrillen ($k_{ext} \sim 5 F_0/\mu m$). Eine grosse Auffächerung bewirkt weiter, dass gewisse Halb-Sarkomere die optimale Länge der maximalen Überlappung von Actin und Myosin verlassen können, auch wenn die mittlere Länge der Halb-Sarkomere noch im Bereich der optimalen Länge ist. Somit kann die Kraft nach einer gewissen Zeit der Aktivierung abnehmen, wenn die Auffächerung zu gross wird. Folglich kann mit der Kraft-Längen-Relation der mittleren Halb-Sarkomer-Längen in einer Myofibrille nicht der genaue Überlappungsgrad von Actin und Myosin in jedem einzelnen Halb-Sarkomer beschrieben werden, was auch Telley et al. (2006b) bemerkt haben.

Weiter bildet die Auffächerung am Ende der Aktivierung die Basis der sequenziellen Relaxation, in der das schwächste und somit längste Halb-Sarkomer beginnt, sich zu verlängern, bis es von den passiven Strukturen (Titin) gehalten wird. Danach startet die Verlängerung des benachbarten Halb-Sarkomers usw. Obwohl unser Modell keine räumliche Ordnung beinhaltet, zeigen erste Voruntersuchungen von Simulationen, dass eine zeitlich sequenzielle Relaxation simuliert werden kann. Die zeitliche Sequenz pflanzt sich von schwach zu stark bzw. von lang zu kurz fort.

Die experimentellen Daten sowie die hier gezeigten theoretischen Überlegungen und Simulationen zeigen auf, in welcher Phase der Kontraktion die Dynamik der Halb-Sarkomere auftritt und welchen Einfluss die Dynamik der Halb-Sarkomere auf das Verhalten und die Kraftantwort einer Myofibrille hat. Die Halb-Sarkomere in einer Myofibrille sind im längengesteuerten Fall miteinander gekoppelt, sodass die Bewegung eines einzelnen Halb-Sarkomers von der Bewegung der anderen Halb-Sarkomere abhängt. Dieses Verhalten ist sehr komplex, sodass Beobachtungen auf der Ebene von Muskelfasern und ganzen Muskeln nur approximativ mit biochemischen Prozessen in den Halb-Sarkomeren interpretiert werden können. Das Gleiche gilt für mechanische Reize im Training und in der Therapie. Wird ein Muskel isokinetisch kontrahiert, verkürzen einzelne Halb-Sarkomere schneller als andere. Während einer isometrischen Belastung verkürzen die starken Halb-Sarkomere, während die schwachen verlängern. Somit können die starken Halb-Sarkomere die optimale Länge verlassen und der Muskel kann sein theoretisch maximales Kraftpotenzial nicht mehr erreichen. Diese Überlegungen zeigen, dass sich die Halb-Sarkomere nicht homogen verhalten und somit nur schwer von äusseren Bewegungen von Muskeln auf die genaue lokale Dynamik und Physiologie geschlossen werden kann.

Korrespondenzadresse:

Jachen Denoth, Institut für Biomechanik, ETH Zürich, HCI 357.1, CH-8093 Zürich, E-Mail: jdenoth@ethz.ch

Literaturverzeichnis

- Denoth J., Stussi E., Csucs G., Danuser G. (2002): Single muscle fiber contraction is dictated by inter-sarcomere dynamics. *J. Theor. Biol.* 216, 101–122.
- Edman K.A. (2005): Contractile properties of mouse single muscle fibers, a comparison with amphibian muscle fibers. *J. Exp. Biol.* 208, 1905–1913.
- Gordon A.M., Huxley A.F., Julian F.J. (1966): The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J. Physiol.* 184, 170–192.
- Higuchi H., Yanagida T., Goldman Y.E. (1995): Compliance of thin filaments in skinned fibers of rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.* 69, 1000–1010.
- Hill A.V. (1938): The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. R. Soc. B.* 126, 136–195.
- Huxley A.F. (1957): Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 7, 255–318.
- Kellermayer M.S., Smith S.B., Granzier H.L., Bustamante C. (1997): Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science* 276, 1112–1116.
- Linari M., Caremani M., Piperio C., Brandt P., Lombardi V. (2007): Stiffness and fraction of Myosin motors responsible for active force in permeabilized muscle fibers from rabbit psoas. *Biophys. J.* 92, 2476–2490.
- Linke W.A. (2000): Stretching molecular springs: elasticity of titin filaments in vertebrate striated muscle. *Histol. Histopathol.* 15, 799–811.
- Minajeva A., Neagoe C., Kulke M., Linke W.A. (2002): Titin-based contribution to shortening velocity of rabbit skeletal myofibrils. *J. Physiol.* 540, 177–188.
- Piazzesi G., Lombardi V. (1996): Simulation of the rapid regeneration of the actin-myosin working stroke with a tight coupling model of muscle contraction. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 17, 45–53.
- Poggesi C., Tesi C., Stehle R. (2005): Sarcomeric determinants of striated muscle relaxation kinetics. *Pflugers Arch.* 449, 505–517.
- Rassier D.E., Herzog W. (2004): Active force inhibition and stretch-induced force enhancement in frog muscle treated with BDM. *J. Appl. Physiol.* 97, 1395–1400.
- Stehle R., Krüger M., Pfitzer G. (2002a): Force kinetics and individual sarcomere dynamics in cardiac myofibrils after rapid Ca(2+) changes. *Biophys. J.* 83, 2152–2161.
- Stehle R., Krüger M., Scherer P., Brixius K., Schwinger R.H., Pfitzer G. (2002b): Isometric force kinetics upon rapid activation and relaxation of mouse, guinea pig and human heart muscle studied on the subcellular myofibrillar level. *Basic Res. Cardiol.* 97 (Suppl. 1), 127–135.
- Stöcker U., Telley I.A., Stussi E., Denoth J. (2008): Multi-segmental model of a myofibril incorporating chemo-mechanical coupling. *Biophys. J.* submitted.
- Sugi H., Tsuchiya T. (1998): Muscle mechanics I: intact single muscle fibres. In: *Current methods in muscle physiology: advantages, problems and limitations*, 1st edn., H. Sugi (ed.), pp. 3–31. Oxford University Press, New York.
- Sun Y.B., Hilber K., Irving M. (2001): Effect of active shortening on the rate of ATP utilisation by rabbit psoas muscle fibres. *J. Physiol.* 531, 781–791.
- Talbot J.A., Morgan D.L. (1996): Quantitative analysis of sarcomere non-uniformities in active muscle following a stretch. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 17, 261–268.
- Telley I.A., Denoth J. (2007): Sarcomere dynamics during muscular contraction and their implications to muscle function. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 28, 89–104.
- Telley I.A., Denoth J., Ranatunga K.W. (2003): Inter-sarcomere dynamics in muscle fibres. A neglected subject? *Adv. Exp. Med. Biol.* 538, 481–500.
- Telley I.A., Denoth J., Stussi E., Pfitzer G., Stehle R. (2006a): Half-sarcomere dynamics in myofibrils during activation and relaxation studied by tracking fluorescent markers. *Biophys. J.* 90, 514–530.
- Telley I.A., Stehle R., Ranatunga K.W., Pfitzer G., Stussi E., Denoth J. (2006b): Dynamic behaviour of half-sarcomeres during and after stretch in activated psoas myofibrils: sarcomere asymmetry but no 'sarcomere popping'. *J. Physiol.* 573, 173–185.
- Tesi C., Piroddi N., Colomo F., Poggesi C. (2002): Relaxation kinetics following sudden Ca(2+) reduction in single myofibrils from skeletal muscle. *Biophys. J.* 83, 2142–2151.