

# CO<sub>2</sub>- Permeabilität biologischer Membranen - am Beispiel von Erythrocyten und gastrointestinalen Epithelien

## Stand der Forschung

Das klassische Konzept der leichten Permeation von Gasen durch den Lipidanteil der Zellmembranen ist in den letzten Jahren zunehmend durch Befunde in Frage gestellt worden, die zeigen, daß

1. einige Zellmembranen impermeabel für CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> sind, während andere diese Gase sehr leicht permeieren lassen,
2. der Wasserkanal Aquaporin-1, vielleicht auch andere Aquaporin-Isoformen, auch einen "Kanal" für CO<sub>2</sub> darstellt und die CO<sub>2</sub>-Permeabilität biologischer Membranen nennenswert erhöht,
3. möglicherweise ein weiteres Membranprotein, die Bande 3, die in der Erythrocytenmembran den HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cl<sup>-</sup> Austausch repräsentiert, einen Transportweg für molekulares CO<sub>2</sub> durch Membranen darstellt (s. eigene Vorarbeiten).

Damit gäbe es offenbar strukturelle Besonderheiten der Zellmembranen, die einerseits die Membran für diese Gase impermeabel, andere jedoch, die ihr eine extrem hohe Permeabilität verleihen können.

**I. Gaspermeabilität an lipid bilayers.** - Insbesondere die Gruppe von Mark Zeidel hat in den letzten Jahren gezeigt, daß die Permeabilität von künstlichen Membranen je nach Fluidität und Lipid-Zusammensetzung insbesondere für NH<sub>3</sub> sehr unterschiedlich sein kann. Z.B. variierte die NH<sub>3</sub>-Permeabilität von künstlichen Liposomen zwischen  $0.1 \times 10^{-4}$  cm/s und  $80 \times 10^{-4}$  cm/s (1). Dagegen schien die CO<sub>2</sub>-Permeabilität nicht von der Fluidität der Liposomen abhängig zu sein (2). Die genannten NH<sub>3</sub>-Permeabilitäten von Liposomen sind sämtlich erheblich niedriger als die sehr hohe NH<sub>3</sub>-Permeabilität der Erythrocytenmembran von 0.2 cm/s (3), aber vergleichbar mit der Permeabilität  $P_{\text{NH}_3} = 5 \times 10^{-4}$  cm/s der apikalen Membran von Harnblasenepithel, die eine erhebliche Permeabilitätsbarriere auch für Wasser, Harnstoff und Protonen darstellt (4). Ebenfalls recht hoch ist die NH<sub>3</sub>-Permeabilitätsbarriere der Zellmembranen der Epithelien des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife der Rattenniere, für die eine  $P_{\text{NH}_3}$  von  $20 \times 10^{-4}$  -  $30 \times 10^{-4}$  cm/s berichtet wurde (5).

Gutknecht et al. (6) haben in einer sorgfältigen Untersuchung an Lipiddoppelschichten, deren Zusammensetzung sie allerdings nicht variierten, eine CO<sub>2</sub>-Permeabilität von 0.35 cm/s ermittelt. Dieser Wert ist zwar sehr hoch, doch ist die CO<sub>2</sub>-Permeabilität von Erythrocytenmembranen noch etwa 10 mal höher (~2 cm/s; 7,8). Man kann also den Schluß ziehen, daß zumindest im Fall von NH<sub>3</sub> die Gaspermeabilität von Lipidschichten stark von deren Zusammensetzung abhängt. Biologische Membranen können eine ähnlich niedrige Gaspermeabilität aufweisen wie Lipidschichten mit niedriger Gaspermeabilität; sie können aber auch, vermutlich durch die Anwesenheit von speziellen Membranproteinen, sehr viel höhere Permeabilitäten erreichen als pure Lipidschichten.

**II. Zellmembranen als Barrieren für den Gastransport.** - Frühe Berichte von Zellmembranen mit hohem Diffusionswiderstand für NH<sub>3</sub> sind die von Kikeri et al. (9) für Nierenepithelien und von Burckhardt und Frömter (10) für die Zellmembran von *Xenopus laevis* Oocyten. In jüngerer Zeit wurden solche Befunde erhoben für den dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (5) und für das Harnblasenepithel (4). Singh et al. (11) zeigten, daß die apikalen Membranen des Kryptenepithels vom Kaninchen-Colon praktisch

impermeabel für  $\text{NH}_3$  sind, während die basolateralen Membranen eine hohe Permeabilität aufweisen. Waisbren et al. (12) und Boron et al. (13) zeigten, daß die Epithelien von Magenkrypten sich ähnlich verhalten: die apikalen Membranen sind für  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  impermeabel, die basolateralen Membranen dagegen für beide Gase gut permeabel.

**III. Aquaporin als "CO<sub>2</sub>-Kanal".** - Nakhoul et al. (14) und Cooper and Boron (15) haben gezeigt, daß die Rate der intrazellulären Acidifizierung von *Xenopus laevis* Oocyten nach einem sprunghaften Anstieg des extrazellulären  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks im Vergleich zu Kontroll-Oocyten größer ist, wenn die Oocyten humanes Aquaporin-1 (AQP-1) exprimieren. Die beschleunigte intrazelluläre Ansäuerung wurde als Ausdruck einer durch die Anwesenheit von Aquaporin-1 bedingten Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität der Oocytenmembran interpretiert. pCMBS, ein bekannter Hemmstoff der Wasserpermeabilität von Aquaporin-1, hemmte auch die  $\text{CO}_2$ -Permeabilität, d.h. es verlangsamte die intrazelluläre Ansäuerung. Der Rolle von Aquaporin-1 als  $\text{CO}_2$ -Transportweg wurde widersprochen von Yang et al. (16), die keine Unterschiede in der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität der Erythrocytenmembran von AQP-1-defizienten und normalen Mäusen fanden, und keinen Effekt der Rekonstitution von AQP-1 in künstlichen Liposomen auf deren  $\text{CO}_2$ -Permeabilität. Wir sind der Meinung, daß die Beobachtungen von Yang et al. (16) ein Artefakt darstellen, da die  $\text{CO}_2$ -Permeabilitäten, die für Erythrocyten ( $P_{\text{CO}_2} = 0.01 \text{ cm/s}$ ) wie auch diejenigen, die für Liposomen erhalten wurden ( $P_{\text{CO}_2} = 0.001 \text{ cm/s}$ ), mindestens zwei Größenordnungen unter den in der Literatur berichteten  $\text{CO}_2$ -Permeabilitäten von Erythrocyten ( $2 \text{ cm/s}$ ; s.o.) und Lipiddoppelschichten ( $0.35 \text{ cm/s}$ ) liegen. Das bedeutet u.E., daß bei den stopped-flow-Messungen von Yang et al. (16) unstirred layers in einem solchen Ausmaß vorhanden waren, daß der Diffusionswiderstand der unstirred layer erheblich größer als der Diffusionswiderstand der Membranen war und das Meßsignal dominierte. Im Gegensatz zu Yang et al. (16) fanden Prasad et al. (17) eine markante Zunahme der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität von Phospholipid-Vesikeln durch den Einbau von AQP-1, die durch  $\text{HgCl}_2$  hemmbar war. Im Einklang damit steht, daß diese Autoren in Liposomen erheblich höhere  $\text{CO}_2$ -Permeabilitäten fanden als Yang et al. (16): in Kontroll-Liposomen war  $P_{\text{CO}_2} = 0.5 \text{ cm/s}$ , in AQP-1-rekonstituierten Liposomen war  $P_{\text{CO}_2} = 2.0 \text{ cm/s}$ . Unstirred layer - Effekte spielten also hier eine sehr viel geringere Rolle. Prasad et al. (17) bestätigen damit die Beobachtungen von Nakhoul et al. und Cooper and Boron.

**IV. Pathophysiologische Bedeutung der Barrierefunktion der apikalen Epithelmembran für  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  in Colon und Magen.** - Im Colon und im Magen können sehr hohe  $\text{CO}_2$ -Partialdrucke auftreten (z.B. im Colon  $\sim 0,5 \text{ atm}$ ), ebenso liegen hohe Ammoniak-Konzentrationen im Colon (4 bis 70 mM) und insbesondere im Helicobacter-infizierten Magen vor. Da derart hohe  $\text{CO}_2$ -Partialdrucke eine massive intrazelluläre Acidose erzeugen würden und die hohen Ammoniak-Konzentrationen im Colon- und Magen-Lumen toxische Effekte auf das Epithel ausüben würden, erscheint es physiologisch sinnvoll, daß die apikalen Epithelmembranen beider Epithelien möglicherweise impermeabel für  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  sind. Im Fall von  $\text{NH}_3$  gibt es Hinweise in der Literatur, daß ein Zusammenbruch dieser Barriere in der Tat eine pathophysiologische Rolle spielt. Zum Beispiel im Fall des Harnblasenepithels, dessen Barrierefunktion für  $\text{NH}_3$  relativ gut belegt ist (4), führt eine (nichtinfektiöse) Cystitis einerseits zu ultrastrukturell nachweisbaren Schädigungen des Epithels und andererseits zu einer ausgeprägten Zunahme der Permeabilität der apikalen Epithelmembranen u.a. für Ammoniak (18). Es wird postuliert, daß das Eindringen von im Harn vorhandenen Substanzen wie Ammoniak zu einer weiteren Schädigung des Epithels führt. Ähnliche Befunde existieren für aus dem ZNS isoliertes Endothel, das nach Vorschädigung durch die proinflammatorischen Cytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  eine erhöhte Permeabilität für  $\text{NH}_3$  zeigt, was zu weiterer Zellschädigung führen kann (19). Im Colon haben Prasad et al. (20) gezeigt, daß  $\text{NH}_3$  die

intestinale cAMP-regulierte Cl-Sekretion hemmt. Wenn die NH<sub>3</sub>-Barriere der apikalen Epithelmembran bei entzündlichen Prozessen geschädigt ist, dringt NH<sub>3</sub> verstärkt in die Zellen ein und es ist zu erwarten, daß dies den elektrogeneren Cl-Transport verstärkt hemmt. Damit wird die Hydratation der Epitheloberfläche verschlechtert bzw. die "Spülung" der Epitheloberfläche durch den Cl-assoziierten Flüssigkeitsstrom als wichtiger einfacher Abwehrmechanismus ausgeschaltet. Für den Magen haben Suzuki et al. (21) gezeigt, daß im nicht vorgeschädigten Magen NH<sub>3</sub> nur dann epithelschädigend wirkt, wenn es von der basolateralen Seite her angeboten wird, was mit einer postulierten hohen basolateralen und niedrigen apikalen NH<sub>3</sub>-Permeabilität in Einklang steht. War das Magenepithel dagegen vorgeschädigt (durch Triton X-100), so verhinderten auch luminale NH<sub>3</sub>-Konzentrationen wie sie im *Helicobacter-pylori*-infizierten Magen vorliegen die Restitution der vorgeschädigten Schleimhaut, während in Abwesenheit von NH<sub>3</sub> eine vollständige Erholung erfolgte. Ergänzend konnten Suzuki et al. (21) zeigen, daß die Vorschädigung des Epithels mit Triton in der Tat die Permeabilität des Epithels für NH<sub>3</sub> heraufsetzt. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf eine pathogenetische Rolle einer Schädigung der epithelialen (apikalen) Barriere für NH<sub>3</sub>.

## Literatur

1. Hill WG and Zeidel ML. Reconstituting the barrier properties of a water-tight epithelial membrane by design of leaflet-specific liposomes. *J Biol Chem* 2000; 275: 30176-30185.
2. Hill WG, Rivers RL and Zeidel ML. Role of leaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes and gases. *J Gen Physiol* 1999; 114: 405-414.
3. Labotka RJ, Lundberg P and Kuchel PW. Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by 14N and 15N saturation transfer NMR spectroscopy. *Am J Physiol* 1995; 268: C686-C699.
4. Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA and Zeidel ML. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol* 1996; 271: F886-F894.
5. Rivers R, Blanchard A, Eladari D, Leviel F, Paillard M, Podevin R-A and Zeidel ML. Water and solute permeabilities of medullary thick ascending limb apical and basolateral membranes. *Am J Physiol* 1998; 274: F453-F462.
6. Gutknecht J, Bisson MA and Tosteson DC. *J Gen Physiol* 1977; 69: 779-794.
7. Gros G and Bartag I. *Pflügers Arch*
8. Forster RE, Gros G, Lin L, Ono Y and Wunder M. The effect of 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonate on CO<sub>2</sub> permeability of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15815-15820.
9. Kikeri D, Sun A, Zeidel L and Hebert SC. Cell membranes impermeable to NH<sub>3</sub>. *Nature* 1989; 339: 478-480.
10. Burckhardt B-C and Frömter E. Pathways of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Arch* 1992; 420: 83-86.
11. Singh SK, Binder HJ, Geibel JP and Boron WF. An apical permeability barrier to NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in isolated, perfused colonic crypts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11573-11577.
12. Waisbren SJ, Geibel JP, Modlin IM and Boron WF. Unusual permeability properties of gastric gland cells. *Nature* 1994; 368: 332-335.
13. Boron WF, Waisbren SJ, Modlin IM and Geibel JP. Unique permeability barrier of the apical surface of parietal and chief cells in isolated perfused gastric glands. *J Exp Biol* 1994; 196: 347-360.
14. Nakhoul NL, Davis BA, Romero MF and Boron WF. Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1998; 274: C543-C548.
15. Cooper GJ and Boron WF. Effect of PCMBs on CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. *Am J Physiol* 1998; 274: C543-548.
16. Yang B, Fukuda N, van Hoek A, Matthay MA, Ma T and Verkman AS. Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *J Biol Chem* 2000; 275: 2686-2692.
17. Prasad GVR, Coury LA, Finn F and Zeidel ML. Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO<sub>2</sub> across membranes. *J Biol Chem* 1998; 273: 33123-33126.

18. Lavelle JP, Apodaca G, Meyers SA, Ruiz WG and Zeidel ML. Disruption of guinea pig urinary bladder permeability barrier in noninfectious cystitis. *Am J Physiol* 1998; 274: F205-F214.
19. Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G and Hofman FM. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J Investig Med* 1996; 44: 474-482.
20. Prasad M, Smith JA, Resnick A, Awtrey CS, Hrnjez BJ and Mathews JB. Ammonia inhibits cAMP-regulated intestinal  $\text{Cl}^-$  transport. *J Clin Invest* 1995; 96: 2142-2151.
21. Suzuki H, Yanaka A and Muto H. Luminal ammonia retards restitution of guinea pig injured gastric mucosa in vitro. *Am J Physiol* 2000; 279: G107-G117.

## Bisherige Vorarbeiten

**1.) Massenspektrometrische Methode.** - Es wurde eine massenspektrometrische Methode zur Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität entwickelt (22, 23). Das Prinzip ist die massenspektrometrische Beobachtung des  $^{18}\text{O}$ -Austauschs zwischen  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$  durch kontinuierliche Messung des  $\text{C}^{18}\text{O}_2$ -Partialdrucks in wässriger Lösung. In Anwesenheit von Carboanhydrase (CA) enthaltenden Zellen kommt es zu einem charakteristischen zweiphasischen Verlauf des  $\text{C}^{18}\text{O}_2$ -Signals, aus dem sich neben der  $\text{HCO}_3^-$ -Permeabilität der verwendeten Zellen ihre  $\text{CO}_2$ -Membran-Permeabilität berechnen läßt. Obgleich theoretisch aufwendig, ist die praktische Durchführung der Messungen relativ einfach. Es ist die direkteste verfügbare Meßmethode zur Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität von Zellmembranen. Sie hat allen anderen Methoden gegenüber den Vorzug, daß sie nicht die Einstellung des chemischen Gleichgewichts von  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{HCO}_3^-$  beobachtet, sondern die Einstellung des Isotopengleichgewichts von  $^{18}\text{O}$ , das initial als  $\text{HC}^{18}\text{O}_3^-$  zugegeben wird. Da die Einstellung des Isotopengleichgewichts ca. 60 mal langsamer verläuft als die Einstellung des chemischen Gleichgewichts, ist die Methode wesentlich weniger anfällig für schlecht gerührte Regionen im Reaktionsansatz, sog. unstirred layers. Letztere können ein sehr großes Problem darstellen, wenn die zu messende Membranpermeabilität extrem hoch ist wie dies im Fall des  $\text{CO}_2$  gegeben ist. Die Methode wurde an Erythrocyten systematisch erprobt und liefert hier Permeabilitäten von  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$ , die mit der Literatur gut übereinstimmen (24, 25, 26). Die Methode wurde auch an Schichten intakten Colonepithels erprobt und lieferte hier Werte, die mit den an isolierten Colonocyten erhaltenen Werten gut übereinstimmen (27). Durch Exposition nur der apikalen bzw. nur der basolateralen Seite der Colon-Epithelschicht konnten apikale und basolaterale Permeabilitäten von  $\text{HCO}_3^-$  getrennt erfaßt werden.

**2.  $\text{CO}_2$ -Permeabilität von Erythrocytenmembranen.** - Hier sind wir im Moment dabei, weitergehende Untersuchungen zum Mechanismus der  $\text{CO}_2$ -Permeation durch Erythrocytenmembranen abzuschließen. Untersuchungen mit knockout-Mäusen führen zu dem Schluß, daß es in der Erythrocytenmembran - neben der  $\text{CO}_2$ -Permeation durch die Lipidphase der Membran - zwei Membranproteine gibt, die dafür verantwortlich sind, daß diese Membran eine so extrem hohe Permeabilität für  $\text{CO}_2$  aufweist. Anlaß zu diesen Untersuchungen gab die Beobachtung, daß DIDS, ein Hemmstoff des  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$ -Austauschers (Bande 3 Protein), die  $\text{CO}_2$ -Permeabilität der Erythrocytenmembran auf 1/10 bis 1/20 reduziert (24). Dieser Effekt besteht zusätzlich zum Hemmeffekt auf die  $\text{HCO}_3^-$ -Permeabilität. Um zu klären, ob dieser Effekt von DIDS auf einer Hemmung von Aquaporin-1 oder von einem anderen Protein beruht oder einen unspezifischen Effekt auf die Lipidphase der Membran darstellt, wurden zunächst Erythrocyten von AQP-1-defizientem Humanblut untersucht (Zusammenarbeit Peter Agre, Johns-Hopkins-University, USA). Hier hatte pCMBS, ein etablierter Hemmstoff der Wasserpermeabilität von AQP-1, keinen Effekt auf  $P_{\text{CO}_2}$ , während pCMBS an normalen Erythrocyten eine Reduktion der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität auf ca. 1/5 bewirkt. DIDS dagegen hatte

denselben Effekt wie an normalen Erythrocyten und reduzierte  $P_{\text{CO}_2}$  auf ca. 1/20. Um die Natur des Effektes von DIDS besser zu charakterisieren, wurden Erythrocyten von Bande-3-defizienten Rindern untersucht. Hier war ein Effekt von DIDS auf  $P_{\text{CO}_2}$  nicht nachweisbar, während der Effekt von pCMBS in normaler Größe vorhanden war. Durch Untersuchungen an Erythrocyten von Carbonhydrase II-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, daß keiner der Hemmeffekte durch eine indirekte Wirkung auf die mit dem Bande-3-Protein (und evtl. auch dem AQP-1) assoziiert vorliegende CA II vermittelt wird. Wir schließen hieraus, daß AQP-1 in der Erythrocytenmembran einen Transportweg für  $\text{CO}_2$  darstellt, daß jedoch Bande-3-Protein einen zweiten, noch wirkungsvolleren Transportweg für molekulares  $\text{CO}_2$  repräsentiert.

**3. Vorläufige Ergebnisse an Oocyten und Colon.-** Die Rolle von AQP-1 als  $\text{CO}_2$ -Kanal konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen an AQP-1 exprimierenden Oocyten bestätigt werden. In Anwesenheit von AQP-1 ist die  $\text{CO}_2$ -Permeabilität der Oocytenmembran doppelt so hoch wie an Kontroll-Oocyten.

Nicht bestätigt werden konnte mittels massenspektrometrischer Untersuchungen an intaktem Colonepithel die in der Literatur postulierte Impermeabilität der apikalen Membran für  $\text{CO}_2$ . Waisbren et al. (12) und Boron et al. (13) sowie Singh et al. (11) führten ihre Untersuchungen am Epithel isolierter Krypten durch, während unsere massenspektrometrischen Messungen eine Differenzierung zwischen Oberflächen-Epithel und Kryptenepithel nicht erlauben, da die Messung beide Bereiche gleichzeitig erfaßt. An der apikalen Colonepithelseite erhalten wir ein  $P_{\text{CO}_2}$  von ca.  $10^{-2}$  cm/s. Dies sollte eine recht schnelle Permeation von  $\text{CO}_2$  durch die apikale Membran erlauben und keineswegs zur "Impermeabilität" führen.

**4.  $\text{CO}_2$ -Mikroelektrode.-** Um einen weiteren und möglichst direkten Zugang zur Frage der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität apikaler Membranen in Magen und Colon zu erhalten, haben wir in Zusammenarbeit mit Kai Kaila (Helsinki) die Technik der  $\text{CO}_2$ -Mikroelektrode in unserem Labor etabliert, mit der intrazelluläre Messungen in Oocyten und in Epithelzellen im intakten Epithelverband durchgeführt werden können.

## Literatur

22. Wunder MA, Böllert P and Gros G. Mathematical modelling of the role of intra- and extracellular activity of carbonic anhydrase and membrane permeabilities of  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CO}_2$  in  $^{18}\text{O}$  exchange. *Isotopes Envir Health Studies* 1997; 33: 197-205.
23. Wunder MA and Gros G.  $^{18}\text{O}$  exchange in suspensions of red blood cells: determination of parameters of mass spectrometer inlet system. *Isotopes Environ Health Studies* 1998; 34: 303-310.
24. Forster RE, Gros G, Lin L, Ono Y and Wunder M. The effect of 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonate on  $\text{CO}_2$  permeability of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15815-15820.
25. Peters T, Forster RE and Gros G. Hagfish (*Myxine glutinosa*) red cell membranes exhibit no bicarbonate permeability as detected by  $^{18}\text{O}$ -exchange. *J Exp Biol* 2000; 203: 1551-1560.
26. Peters T, Papadopoulos F, Kubis HP and Gros G. Properties of a carbonic anhydrase inhibitor protein in flounder serum. *J Exp Biol* 2000; 203: 3003-3009.
27. Böllert P, Peters T, v. Engelhardt W and Gros G. Mass spectrometric determination of  $\text{HCO}_3^-$  permeability and carbonic anhydrase activity in intact guinea-pig colon epithelium. *J Physiol* 1997; 502: 679-691.

## Ziele, Methoden, und Arbeitsprogramm

### 3.5.1 Ziele

1. Mit zwei unabhängigen Methoden soll bestätigt werden, daß im Magen und/oder im Colon Zellmembranen existieren, die "impermeabel" für CO<sub>2</sub> und/oder NH<sub>3</sub> sind.
2. Die molekularen Grundlagen der apikalen "Impermeabilität" und der basolateralen hohen Gaspermeabilität sollen mittels unterschiedlicher Zugänge untersucht werden.
3. Die Beiträge von AQP-1, anderen Aquaporin-Isoformen und vom Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher zur CO<sub>2</sub>- und NH<sub>3</sub>-Permeabilität sollen durch Expression dieser Proteine in Oocyten quantifiziert werden. An Oocyten sollen auch die beiden zum Einsatz gelangenden Methoden (Mikroelektroden bzw. Massenspektrometer) vergleichend getestet werden.
4. Am Helicobacter-infizierten Magen vom Gerbil als Tiermodell und humanen Biopsien soll untersucht werden, ob die Infektion einen Zusammenbruch der Barriere für NH<sub>3</sub> bzw. CO<sub>2</sub> auslöst und dann die hohe NH<sub>3</sub>-Produktion durch Helicobacter eine weitere Epithelschädigung initiiert.
5. Analoge Untersuchungen der Gaspermeabilität sollen am Colon der IL-10-defizienten Maus (als Colitismodell) durchgeführt werden.

### Methoden

1. Die massenspektrometrische Methode wird zur Messung der CO<sub>2</sub>-Permeabilität von a) intaktem Epithel von Magen und Colon und b) von apikalen and basolateralen Membranvesikeln und c) von Oocyten eingesetzt.
2. Die CO<sub>2</sub>-Mikroelektrode wird als alternative Methode zur Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Membranpermeabilität von Epithelien und Oocyten eingesetzt, insbesondere um die Impermeabilität der basolateralen Membranen für CO<sub>2</sub> nachzuweisen. Vorversuche zur P<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Bestimmung an Oocyten existieren bereits.
3. Die pH-Mikroelektrode, die seit längerer Zeit in unserem Labor etabliert ist, wird analog dazu eingesetzt, um die NH<sub>3</sub>-Permeabilität von Epithelzellen und Oocyten indirekt zu erfassen. NH<sub>3</sub>-Einstrom in Zellen führt zu einer Alkalinisierung, deren Kinetik die Membranpermeabilität widerspiegelt.
4. Apikale und basolaterale Membranen von Epithel werden in Kooperation mit dem Institut für Biochemie / TiHo nach einem dort etablierten Verfahren isoliert.
5. Die Expression von Aquaporin-Isoformen und von Bande-3-Protein in Oocyten wird in Zusammenarbeit mit Dr. A. Verkman (UCSF, USA) und Dr. L. Peters (Jackson Laboartory, USA) durchgeführt.

### Arbeitsprogramm

- 1.) Die "Impermeabilität" der apikalen Membranen von Colon und Magen soll zunächst an intakten Epithelschichten massenspektrometrisch bestimmt werden. Zur Absicherung der Berechnung der CO<sub>2</sub>-Permeabilität aus diesen Messungen soll unabhängig an isolierten Colonocyten (27) die intrazelluläre Carboanhydrase-Aktivität der Epithelzellen bestimmt werden. Dies ist essentiell für die vorliegende Fragestellung, da eine grobe Fehleinschätzung

der CA-Aktivität zu einer erheblichen Fehlberechnung der CO<sub>2</sub>-Permeabilität führen kann. Dagegen ist der dritte Parameter, der den <sup>18</sup>O-Austausch bestimmt, P<sub>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub>, für die Ermittlung von P<sub>CO<sub>2</sub></sub> nicht kritisch. Intaktes Colon soll vom Meerschweinchen entnommen werden ( wegen bestehender Voruntersuchungen und aus Gründen der Größe), Magenepithel vom nichtinfizierten Gerbil. Die Messungen werden vergleichend für die apikale und die basolaterale Seite durchgeführt.

An denselben Epithelien sollen P<sub>CO<sub>2</sub></sub> und P<sub>NH<sub>3</sub></sub> mittels der CO<sub>2</sub>-Mikroelektrode bzw. der pH-Mikroelektrode bestimmt werden. Durch Einstechen der Elektrode auf der basalen Seite kann die (apikale) Permeabilität für von apikal her angebotenes CO<sub>2</sub> bzw. NH<sub>3</sub> bestimmt werden. Dies soll an Magen- und Colon-Epithel und jeweils getrennt an Kryptenepithel und an Oberflächenepithel durchgeführt werden.

2.) Den molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Permeabilitäten basolateraler und apikaler Membranen wollen wir uns mittels zweier Zugänge annähern.

A) In massenspektrometrischen Untersuchungen an intakten Epithelien sollen sowohl apikal wie basolateral Hemmstoffe von AQP (pCMBS, HgCl<sub>2</sub>) und vom Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher (DIDS) angeboten werden und deren Effekt auf die CO<sub>2</sub>-Permeabilität beobachtet werden. Dies wird Hinweise darauf geben, ob in der basolateralen Membran die bisher gefundenen "CO<sub>2</sub>-Transporter" anwesend sind und die CO<sub>2</sub>-Permeabilität heraufsetzen und in der apikalen Membran fehlen bzw. keine Effekte auf P<sub>CO<sub>2</sub></sub> haben.

B) In Zusammenarbeit mit dem Projekt Sallmann/Busche sollen künstliche Lipidvesikel mit einer der apikalen bzw. basolateralen Membran ähnlichen Lipidzusammensetzung hergestellt werden. Deren CO<sub>2</sub>-Permeabilität soll im Massenspektrometer bestimmt werden. Vergleichend werden apikale und basolaterale Vesikel aus Epithel isoliert und deren CO<sub>2</sub>-Permeabilität bestimmt. Der Vergleich soll zeigen, ob die Vorstellung zutreffend ist, daß es einerseits Lipidzusammensetzungen gibt, die zu niedrigen CO<sub>2</sub>-Permeabilitäten führen, und daß andererseits besonders hohe Permeabilitäten durch den Einbau von "CO<sub>2</sub>-Kanälen" in die Membran erreicht werden.

3.) Die Fähigkeit zum CO<sub>2</sub>-Transport ist bisher nur für AQP-1 beschrieben worden. Jedoch ist nur im Colon, nicht im Magen, AQP-1 demonstriert worden. Andererseits sind andere Aquaporin-Isoformen wie AQP-3, AQP-4 und AQP-8, vor allem in den basolateralen Membranen, beschrieben worden. Durch Expression dieser Isoformen in Oocyten in Zusammenarbeit mit Dr. Verkman (San Francisco) soll deren Einfluß auf die CO<sub>2</sub>- und NH<sub>3</sub>-Permeabilität untersucht werden. Ebenso soll in Zusammenarbeit mit Dr. Peters (Bar Harbor) das Bande-3-Protein in Oocyten exprimiert werden, um dessen Effekt auf P<sub>CO<sub>2</sub></sub> quantitativ zu definieren. Zweck dieser Untersuchungen ist es, die oben beschriebenen an Erythrocyten erhaltenen Vorstellungen über CO<sub>2</sub>-transportierende Membranproteine zu bestätigen und zu erweitern. Diese Untersuchungen sollen mittels der CO<sub>2</sub>- bzw. der pH-Mikroelektrode durchgeführt werden. Gleichzeitig soll überprüft werden, welche der gängigen Hemmstoffe die CO<sub>2</sub>-Permeabilität der verschiedenen Aquaporine zu hemmen vermögen.

4.) An Magenepithel vom Gerbil soll der Effekt einer Helicobacter-pylori-Infektion auf die Gaspermeabilitätsbarriere untersucht werden. Dies soll für beide Gase, NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub>, geschehen und es sollen dafür die pH- bzw. die CO<sub>2</sub>-Mikroelektrode eingesetzt werden. Dadurch genügt es, kleine Epithelstücke zur Verfügung zu haben. Daher ist geplant, dieselben Messungen an humanen Magenbiopsien durchzuführen. Falls die apikale Barriere für CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> durch die Infektion zerstört wird, ist es wahrscheinlich, daß die toxischen Effekte von NH<sub>3</sub> und die durch CO<sub>2</sub> bewirkte Acidose wesentlich zur Epithelschädigung bei Helicobacter-

Infektion beitragen. Im fall der humanen Biopsien soll geprüft werden, ob sich erkrankte und nicht erkrankte Helicobacter-infizierte Magenschleimhäute hinsichtlich der Barrierefunktion für Gase unterscheiden. Falls aufgehobene Barrierefunktion und tatsächliche Erkrankung korrelieren, wäre dies ein Hinweis auf eine wichtige pathogenetische Rolle erhöhter epithelialer Permeabilitäten für  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  (Zusammenarbeit mit Projekt Wagner/Beil/Mähler)..

5.) Entsprechende Messungen sollen am Colon der IL-10-defizienten Maus als Modell einer chronischen Colitis im Vergleich zum Colon normaler Mäuse durchgeführt werden. Mittels  $\text{CO}_2$ - und  $\text{NH}_3$ -Mikroelektroden sollen die apikalen Gaspermeabilitäten bestimmt werden, um die Frage zu beantworten, ob chronische Colitis zu einer Aufhebung der apikalen Barriere für die beiden Gase führt (in Zusammenarbeit mit Projekt Müller).