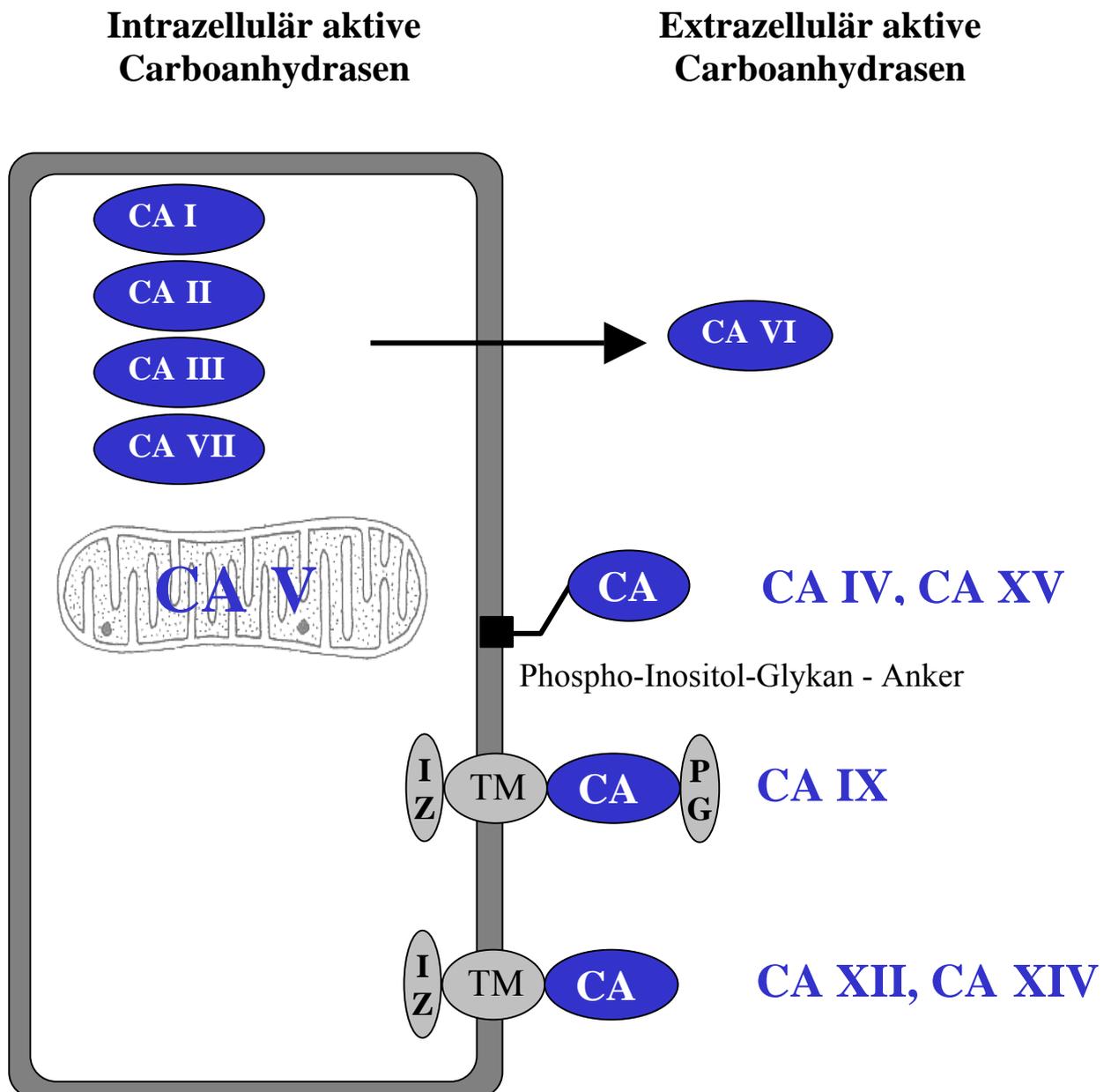


Funktionen der Carboanhydrase-Isoenzyme im Muskel und anderen Geweben

Innerhalb der α -Carboanhydrase (CA) Genfamilie der Säugetiere gibt es bisher zwölf enzymatisch aktive CA Isoformen. Bei fünf Isoformen handelt es sich um zytosolische Enzyme (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), weitere fünf Isoenzyme sind membrangebunden (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV, CA XV), zwei befinden sich in Mitochondrien (CA VA und CA VB), und ein Isoenzym stellt eine sekretorische Isoform dar (CA VI). Drei Proteine sind durch eine homologe "CA-like" Domäne charakterisiert, sie sind aber nicht katalytisch aktiv (CA-Related Proteins, CA-RP VIII, CA-RP X, CA-RP XI).



Im Muskel sind folgende CA Isoformen vorhanden:

- ❑ membrangebundene CA IV und CA XIV in der Plasmamembran von Herz- und Skelettmuskelzellen
- ❑ membrangebundene CA IV, CA IX und CA XIV in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums von Herz- und Skelettmuskelzellen
- ❑ zytosolische CA III in oxidativen, langsam-kontrahierenden Muskelfasern vom Typ-1

Mögliche Funktionen der CA Isoenzyme im Skelettmuskel:

CA IV und CA XIV in der Plasmamembran

Sowohl die CA IV als auch die CA XIV sind im Extrazellularraum katalytisch aktiv. Dort beschleunigen sie die Hydratations- und Dehydratationsreaktion von $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Damit befähigen sie das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ Puffersystem sowohl schnell H^+ - sowie HCO_3^- -Ionen produzieren zu können, die an der Plasmamembran durch Transportmoleküle in die Muskelzelle hinein transportiert werden, als auch schnell H^+ - sowie HCO_3^- -Ionen abpuffern zu können, die aus der Zelle hinaus transportiert worden sind. In Frage kommende Transportmoleküle an der Plasmamembran sind der H^+/Laktat -Kotransporter, der $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher und der H^+/Na^+ -Austauscher.

Elektrophysiologische Untersuchungen mit pH-Mikroelektroden an einzelnen, isolierten Muskelfasern sollen Aufschluss darüber geben, ob ein CA Isoenzym funktionell mit einem spezifischen Transportmolekül zusammenarbeitet. Dazu dienen Muskeln von CA IV- und CA XIV -knockout Mäusen sowie von CA IV/XIV doppelt-knockout Mäusen.

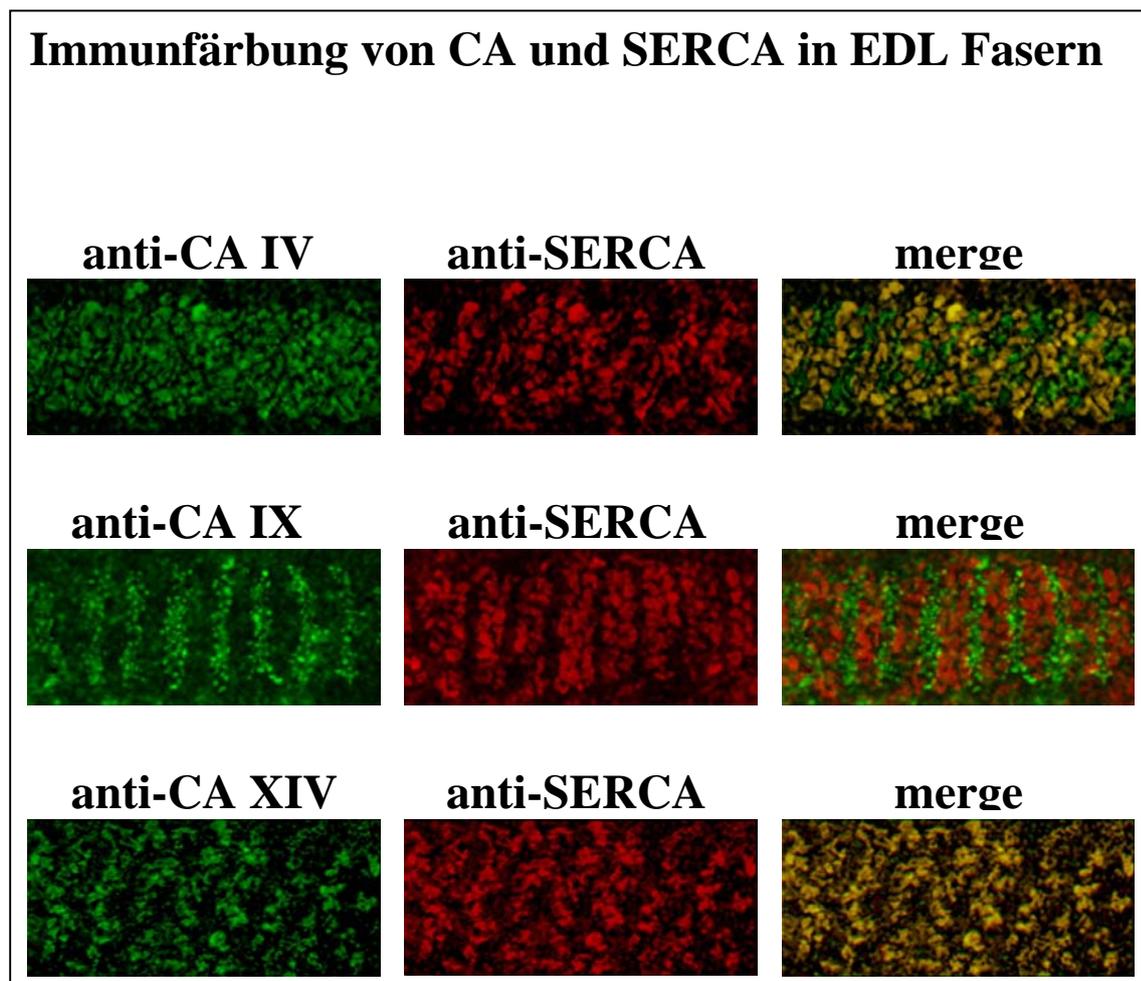
CA IV, CA IX und CA XIV in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums

Bei der elektromechanischen Kopplung werden Ca^{++} Ionen innerhalb weniger ms aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Ryanodin-Rezeptor in das Zytoplasma freigesetzt. Durch die Ca^{++} -ATPase (SERCA) werden sie wieder in das SR zurück gepumpt. Sowohl die Ca^{++} -Freisetzung als auch die Ca^{++} -Wiederaufnahme werden von einem Transport von H^+ Ionen begleitet, um die positiven Ladungen, die mit den transportierten Ca^{++} Ionen an der SR Membran verschoben werden, teilweise auszugleichen. Eine in der SR

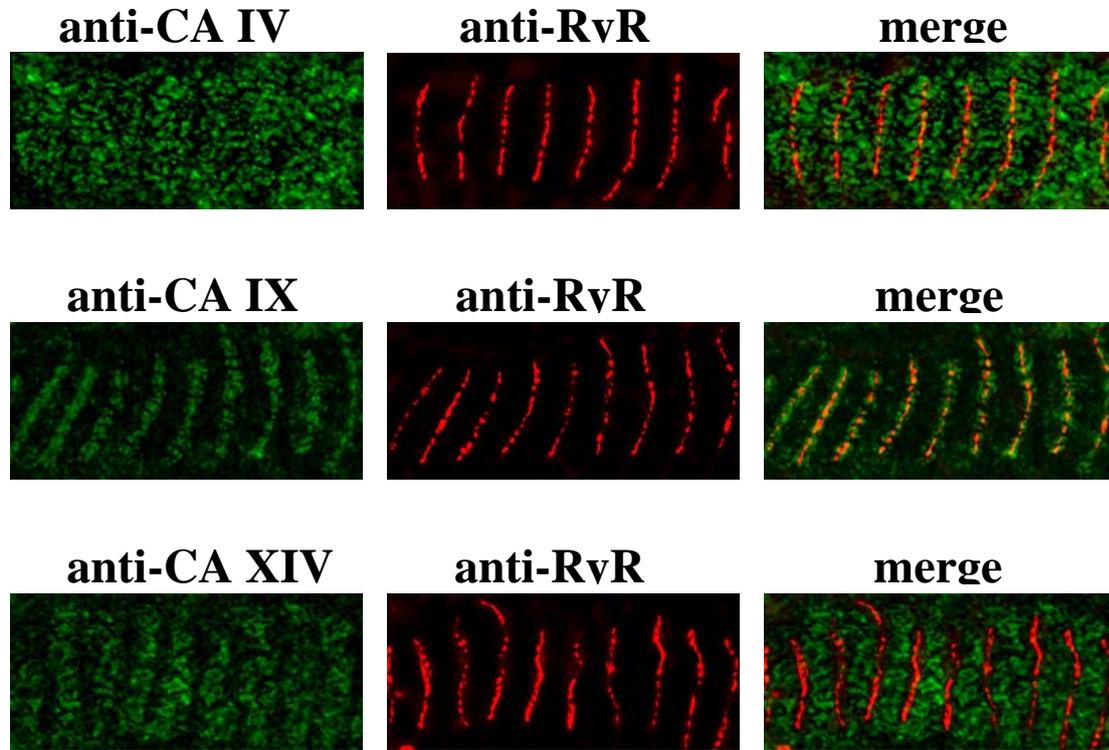
Membran lokalisierte CA kann durch Katalyse des intrazellulären $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ Puffersystems eine ausreichend schnelle Bereitstellung von zu transportierenden H^+ Ionen bzw. eine ausreichend schnelle Abpufferung von transportierten H^+ Ionen garantieren.

Immunhistochemische Untersuchungen an Muskelfasern des M. extensor digitorum longus der Maus mit spezifischen anti-CA Antikörpern sowie mit anti-Ryanodin-Rezeptor- und mit anti-SERCA -Antikörpern konnten zeigen, dass die CA Isoenzyme unterschiedlich in der SR Membran verteilt sind. Die CA IX ist im terminalen SR/T-Tubulummembran lokalisiert, wohingegen die CA XIV ausschließlich nur im longitudinalen SR zu finden ist. Die CA IV ist sowohl auf das longitudinale als auch auf das terminale SR verteilt.

Untersuchungen an isolierten Muskelfasern von CA IV-, CA IX- und CA XIV- knockout Mäusen sowie von CA IV/XIV doppelt-knockout und von triple-knockout Mäusen sollen die Frage klären, welches von den drei CA Isoenzymen funktionell eventuell mit dem Ryanodin-Rezeptor bzw. mit der Ca^{++} -ATPase zusammenarbeitet.



Immunfärbung von CA und Ryanodin-Rezeptor in EDL Fasern



CA III in oxidativen, langsam-kontrahierenden Muskelfasern vom Typ-1

Die CA III besitzt zwei im Molekül oberflächlich angeordnete Cysteinreste, Cys 183 und Cys 188, die reversibel mit Glutathion reagieren können oder irreversibel zu Sulfinsäure (Cystein SO_2H) und zu Sulfonsäure (Cystein SO_3H) oxidiert werden können. Es wird deshalb angenommen, dass die CA III die überwiegend oxidativ arbeitenden Muskelfasern vor einer Schädigung durch oxidativen Stress schützt. Besonders empfindlich auf eine Schädigung durch reaktive Sauerstoffradikale reagieren die Myofilamente mit einer Abnahme ihrer Ca^{++} -Sensitivität, die wiederum zu einer verminderten Kraftentwicklung führt.

Untersuchungen an isolierten Muskelfaserbündeln des M. soleus, der bei der Maus zu 50% aus Typ-1 Fasern besteht, sollen diese Hypothese überprüfen. Dazu dienen Soleusfaserbündel von CA III knockout Mäusen sowie von Wildtyp Geschwistertieren.

Angewandte Methoden

- Isometrische Kontraktionsmessungen an isolierten Muskelfaserbündeln der Maus
- Fluoreszenzmikroskopische Messungen intrazellulärer Ca^{++} -Transienten mit Fura-2 sowie Messungen des intrazellulären pH mit BCECF an isolierten Muskelfaserbündeln
- Elektrophysiologische Messungen des extra- und intrazellulären pH an einzelnen Muskelfasern mit pH-Mikroelektroden
- Isolierung gereinigter Membranvesikelfraktionen von Plasmamembranen sowie von Membranen des SR
- Messungen von Leitenzymen verschiedener Muskelmembranen
- Western Blots
- Genotypisierung der CA knockout Mäuse mittels PCR

Literatur

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. (London) 531: 743-756, 2001

Wetzel P., Papadopoulos S., Gros G.
Inhibition of muscle carbonic anhydrase increases rise and relaxation times of twitches in rat skeletal muscle fibres.
Pflügers Arch. 443: 762-770, 2002

Wetzel P., Kleinke T., Papadopoulos S., Gros G.
Inhibition of muscle carbonic anhydrase slows down the Ca^{++} transient in rat skeletal muscle fibres.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283: C1242-C1253, 2002

Kim G., Lee T. H., Wetzel P., Geers C., Robinson M. A., Myers T. G., Owens J. W., Wehr N. B., Eckhaus M. W., Gros G., Wynshaw-Boris A., Levine R. L.
Carbonic anhydrase III is not required in the mouse for normal growth, development, and life span.
Mol. Cell. Biol. 24: 9942-9947, 2004

Beekley M. D., Wetzel P., Kubis H. P., Gros G.

Contractile properties of skeletal muscle fibre bundles from mice deficient in carbonic anhydrase II.

Pflügers Arch. 452: 453-463, 2006

Scheibe R. J., Gros G., Parkkila S., Waheed A., Grubb J. H., Shah G. N., Sly W. S., Wetzel P.

Expression of membrane-bound carbonic anhydrases IV, IX, and XIV in the mouse heart.

J. Histochem. Cytochem. 2006 Aug 21; [Epub ahead of print], PMID: 16924128