

Abteilung Vegetative Physiologie

Direktor: Prof. Dr. Gerolf Gros

Myoglobin, nur ein Sauerstoffspeicher oder auch ein Sauerstofftransporter im Muskel?

Ein Teil der Skelettmuskulatur und der Herzmuskel enthalten den roten Muskelfarbstoff Myoglobin (Mb). Dieses Protein bindet reversibel Sauerstoff und dient damit der Muskulatur als Sauerstoffspeicher, der vorübergehend ein Defizit in der O_2 -Versorgung über das Blutgefäßsystem ausgleichen kann. Das ist z.B. beim schlagenden Herzen während der Systole der Fall, wenn infolge der Kontraktion der Herzkammern die Durchblutung besonders der linken Koronararterie stark vermindert ist. Außer dieser Speicherfunktion bietet das Myoglobin aber auch die Möglichkeit, den intrazellulären O_2 -Transport zu verbessern, indem es sich in der Umgebung der Kapillaren mit O_2 belädt, in Richtung der Mitochondrien diffundiert und dort den Sauerstoff wieder abgibt. Da diese O_2 -Diffusion zusätzlich zur Diffusion von freien O_2 -Molekülen erfolgt, spricht man von "erleichterter" O_2 -Diffusion. In welchem Ausmaß die erleichterte O_2 -Diffusion zum intrazellulären O_2 -Transport beiträgt, hängt zum einen von der Mb-Konzentration und zum anderen von der "Beweglichkeit" der Mb-Moleküle ab, die durch ihren Diffusionskoeffizienten (D_{Mb}) beschrieben wird. Der Wert von D_{Mb} war unbekannt, bis es uns vor einigen Jahren gelang Verfahren zu entwickeln, mit denen er bestimmt werden kann (1, 2). Die ersten Verfahren waren allerdings nur dazu geeignet, die Mb Diffusion in axialer Richtung der Muskelzellen zu messen, während die erleichterte Diffusion im Muskelgewebe aber hauptsächlich in radialer Richtung, d.h. von den Kapillaren in das Innere der Zellen, erfolgt. Mit einem neuen Messverfahren ist es uns nun gelungen, auch den radialen Diffusionskoeffizienten zu bestimmen, was uns in die Lage versetzt, zuverlässigere quantitative Aussagen über die Bedeutung des Mb-bedingten erleichterten O_2 -Transports in Herz- und Skelettmuskulatur zu machen (3).

Messverfahren

Einzelne Skelettmuskelfasern oder Herzmuskelzellen werden freipräpariert bzw. durch eine Kombination mechanischer und chemischer Verfahren aus ihrem Verband gelöst und in eine Messkammer überführt. Hier wird eine hochkonzentrierte Lösung von fluoreszenzmarkiertem Myoglobin in die Zellen injiziert und gewartet, bis sich das Protein homogen in der Zelle verteilt hat.

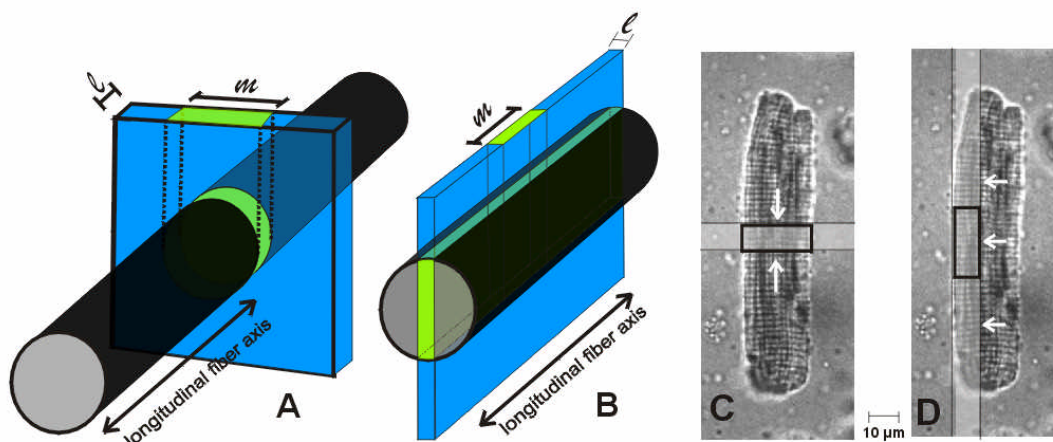


Abb.1: Gebleichte Bereiche in Skelettmuskel- (A, B) und Herzmuskelzellen (C, D) zur Messung der axialen (A, C) und der radialen Diffusion (B, D) von Myoglobin

Dann wird entweder in Richtung der Muskelzell-Längsachse oder senkrecht zur Längsachse ein schmaler Streifen der Zelle (Abb. 1) mit hochintensivem Licht eines Argon-Lasers bestrahlt, wodurch die in dem durchstrahlten Volumen befindlichen fluoreszierenden Moleküle gebleicht werden. Das so erzeugte Konzentrationsgefälle für fluoreszierendes Myoglobin zwischen dem gebleichten Bereich und seiner Umgebung führt zur Eindiffusion von fluoreszierenden Molekülen in den gebleichten Bereich. Dieser Vorgang wird verfolgt, indem die in den vorher gebleichten Bereich eindiffundierenden fluoreszenzmarkierten Moleküle mittels Laserlicht geringer Intensität zur Fluoreszenz angeregt werden und die Intensität des Fluoreszenzlichtes mit einem Mikroskop-Photometer in einem kleinen Volumenausschnitt (m bzw. schwarze Rechtecke in Abb. 1) gemessen wird. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz in dem zuvor gebleichten Volumenausschnitt ist von der Größe des Diffusionskoeffizienten abhängig. Wir ermitteln seinen Wert, indem wir den Diffusionsvorgang theoretisch durch Lösung der zugrundeliegenden Differentialgleichung beschreiben und D_{Mb} so anpassen, dass theoretischer und gemessener Zeitverlauf übereinstimmen.

Ergebnisse

Registrierte Änderungen der Fluoreszenz als Funktion der Zeit sind in Abb. 2 wiedergegeben. Abb. 2A zeigt Diffusionskinetiken, die man bei Diffusion in axialer Richtung in Fasern des M. soleus der Ratte findet (Kurve s), und im Vergleich dazu die Kinetiken, die man in stark verdünnten (Kurve d) und konzentrierten Myoglobinlösungen (gemessen in dünnen Glaskapillaren) findet. Abb. 2B zeigt die entsprechenden Kurven bei Diffusion in radialer Richtung. Die durchgezogenen Kurven geben die durch Parameteranpassung erhaltenen theoretischen Verläufe wieder. Die daraus ermittelten Ergebnisse für D_{Mb} sind in Tab. 1 wiedergegeben

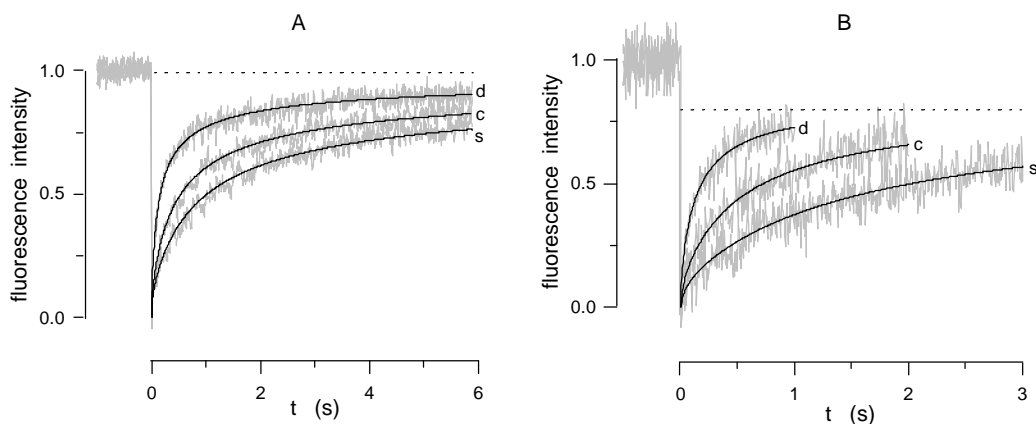


Abb. 2: Axiale (A) und radiale (B) Diffusionskinetiken von fluoreszenzmarkiertem Myoglobin, d: in verdünnter Lösung, c: in konzentrierter Proteinlösung, s: im m. soleus der Ratte.

	Skelettmuskel		Herzmuskel	
	$D_{Mb\ ax}$ (cm ² /s)	$D_{Mb\ rad}$ (cm ² /s)	$D_{Mb\ ax}$ (cm ² /s)	$D_{Mb\ rad}$ (cm ² /s)
Myoglobin (22°C)	$(1.2 \pm 0.4) \cdot 10^{-7}$	$(1.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$	$(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-7}$	$(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-7}$
Myoglobin (37°C)	$(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-7}$			$(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-7}$

Tabelle 1: Diffusionskoeffizienten von Myoglobin in Muskelzellen (Mittelwerte \pm SE)

Es zeigte sich, dass die mit neuer Methode gefundenen axialen Diffusionskoeffizienten in Skelettmuskelzellen (Tab. 1) sehr gut mit den Werten übereinstimmen ($(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$), die wir mit früheren Methoden (1, 2) gefunden haben.

Überraschenderweise unterscheiden sich die radialen Diffusionskoeffizienten nicht von den axialen, obwohl die Struktur der Muskelzellen durchaus anisotrop ist und ein unterschiedlicher Grad der Behinderung der Diffusion in den beiden Richtungen vorstellbar war. Offenbar bilden aber in radialer Richtung die quer zur zum Diffusionsweg verlaufenden filamentären Strukturen ein ähnlich großes Hindernis für die Diffusion von Makromolekülen wie in axialer Richtung die parallel verlaufenden Filamente zusammen mit den Maschenwerken der Z-Scheiben und M-Linien. Praktisch dieselben Befunde wurden an Herzmuskelzellen erhoben; die Diffusionskoeffizienten von Myoglobin in axialer und radialer Richtung unterscheiden sich nicht und ihre Zahlenwerte gleichen den in Skelettmuskelzellen gemessenen.

Insgesamt ergibt sich in Muskelzellen ein D_{Mb} , das nur etwa ein Zehntel des Wertes beträgt, der in verdünnten Lösungen gefunden wird, und nur ein Drittel des Wertes, der in hochkonzentrierten (24 g%) Proteinlösungen vorliegt. Das zeigt, wie stark die strukturellen Hindernisse sich auf die Beweglichkeit der Moleküle auswirken, zusätzlich zu den auch in Lösungen wirksamen viskösen Effekten. Infolgedessen ist der Beitrag der erleichterten Diffusion von Sauerstoff durch Myoglobindiffusion zum intrazellulären O_2 -Transport als eher gering anzusehen.

Modellrechnungen für Skelett- und Herzmuskelgewebe auf der Basis des sog. Krogh-Zylinders zeigen, dass selbst bei maximalem Sauerstoffverbrauch der Beitrag der erleichterten zur Gesamtdiffusion von Sauerstoff im Mittel im Skelettmuskel nur 4% und im Herzmuskel unter 2% ausmacht. Dies ist sowohl durch den relativ kleinen Diffusionskoeffizienten des Myoglobins bedingt als auch durch die Tatsache, dass in großen Teilen des Gewebes das Myoglobin vollständig mit O_2 beladen ist und sich somit kein für einen gerichteten Transport erforderliches Konzentrationsgefälle für oxygeniertes Myoglobin ergibt. Die Bedeutung des Myoglobins als Sauerstofftransporter ist daher dann als sehr gering anzusehen, wenn dem Muskel O_2 ständig über die Blutgefäße zugeführt wird. Bei Unterbrechungen der Durchblutung, wie in der Systole des Herzens, könnte aber neben der dann Bedeutung erlangenden Aufgabe des Myoglobins als Sauerstoffspeicher auch die Transportfunktion ein wenig mehr ins Gewicht fallen, da durch die Verarmung des Gewebes an Sauerstoff in größeren Bereichen des Muskels als sonst Konzentrationsgradienten für Oxymyoglobin entstehen. Abschätzungen zeigen jedoch, dass selbst bei maximalen Konzentrationsgradienten wegen des geringen Diffusionskoeffizienten von Myoglobin die erleichterere O_2 -Diffusion maximal 10 bis 20% zum Gesamtsauerstofftransport beitragen kann.

(1) Jürgens, K.D., Peters, T., Gros, G. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3829-3833.

(2) Papadopoulos, S., Jürgens, K.D., Gros, G. (1995) Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 430:519-525.

(3) Papadopoulos, S., Endeward, V., Révész-Walker, B., Jürgens, K.D., Gros, G. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, im Druck.

Verantwortlich: K.D. Jürgens und G. Gros, Mitarbeiter/innen: S. Papadopoulos, V. Endeward, B. Révész-Walker, C. Geers-Knörr. Förderung: DFG Gr 489/5.

Weitere Forschungsprojekte

Mechanismen der Fasertyptransformation von Skelettmuskeln

Daß adulte Skelettmuskeln sich plastisch verhalten, zeigt sich besonders eindrücklich daran, daß schnelle, weiße Fasern sich unter kontraktiver Dauertätigkeit in langsame, rote umwandeln. Um die intrazellulären Mechanismen zu untersuchen, die diese Umwandlung vermitteln, benutzen wir ein früher entwickeltes Muskelzell-Primärkulturmodell. Die im Rahmen der Weiß-Rot-Transformation erfolgende Herauf-Regulation der langsamen schweren Myosinkette HCl steht unter Kontrolle des Systems Calcineurin/NFAT, welches sowohl durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration durch Zugabe von Ca^{++} -Ionophor als auch durch längerdauernde Elektrostimulation der Myotuben in Kultur aktiviert wird. Die Kinetik des NFAT-Imports in den Zellkern und des Exports aus dem Kern erlaubt es Vorhersagen zu machen, welche Dauer abwechselnde Phasen der Muskelaktivität und der Muskelinaktivität haben können, ohne daß der Prozeß der Fasertransformation unterbrochen wird. Die bei der Weiß-Rot-Transformation stattfindende Herunter-Regulation der schnellen schweren Myosinkette HCII und die Umstellung der Stoffwechsellzyme von einem anaeroben auf ein oxidatives Muster scheinen ebenfalls unter der Kontrolle des intrazellulären Ca^{++} -Spiegels, jedoch nicht von Calcineurin/NFAT, zu stehen. Als weitere Kandidaten für beteiligte intrazelluläre Signalkaskaden untersuchen wir das kleine G-Protein ras (mittels Transfektionsstudien) und die Proteinkinase C (mittels spezifischer Hemmer). Geplant ist auch die Einbeziehung von humanen Satellitenzellen in das Projekt, um deren Differenzierungsfähigkeit zu untersuchen.

Mitarbeiter: H.P. Kubis, J.D. Meißner, R. Scheibe, M. Scholz, S. Spalthoff, G. Gros. Förderung: DFG Gr 489/13-1/-2

Muskelfunktion von Carboanhydrase II- und Carboanhydrase III-defizienten Mäusen.

Beide Carboanhydrase-Isoenzyme scheinen eine nicht bzw. nur teilweise verstandene Rolle für die Funktion von Skelettmuskeln, Muskelkontraktion und/oder Muskelstoffwechsel, zu spielen. Wir untersuchen die kontraktiven Eigenschaften von Faserbündeln aus Hinterlaufmuskeln der beiden knockout-Mäuse, von denen wir hier eine Zucht aufgebaut haben. Daneben werden die Muster der Isomyosine und einige Stoffwechsel-Leitenzyme in diesen Muskeln untersucht, um evtl. erfolgte Anpassungen zu erfassen. Bisherige Ergebnisse zeigen, daß die Kontraktionszeiten der Muskeln von Carboanhydrase II-defizienten Tieren stark verlangsamt sind. Um diesen Befund interpretieren zu können, soll die noch unklare subzelluläre Lokalisation der Carboanhydrase II im Muskeln ergänzend untersucht werden.

Mitarbeiter: M.D. Beekley, P. Wetzel, H.P. Kubis, G. Gros. Kooperation: R. Levine, NIH, Bethesda, USA

Membrangebundene Carboanhydrasen im Skelettmuskel

Nach dem erfolgten physiologischen Nachweis wichtiger Funktionen einer extrazellulären (sarkolemmalen) und einer intrazellulären (L-System) membrangebundenen Carboanhydrase für Milchsäureabgabe, Muskelkontraktion und Ca^{++} -Transient soll die Identität dieser Enzyme aufgeklärt und ihre vermutete subzelluläre Lokalisation überprüft werden.

Mitarbeiter: P. Wetzel, G. Gros.

Membrangebundene Carboanhydrase im Herzen

Die membrangebundene Carboanhydrase von Cardiomyocyten stellt nach bisherigen Untersuchungen ein bisher nicht bekanntes Isoenzym dar. Wir haben dieses Isoenzym nach der Isolation humaner Cardiomyocyten aus deren Membranfraktion durch Affinitätschromatographie rein dargestellt. Nach Bestimmung der Primärstruktur des Isoenzym sollen Antikörper erzeugt und zur Bestimmung seiner ultrastrukturellen Lokalisation eingesetzt werden. Längerfristiges Ziel ist die Aufklärung der Funktion dieser Carboanhydrase für die Cardiomyocyten.

Mitarbeiter: H.P. Kubis, M. Schmidt, C. Geers-Knörr, G. Gros. Kooperation: IPF, Prof. Forßmann. Förderung durch HILF-Programm.

Carboanhydrase im gastrointestinalen Mucus

Nach dem Nachweis hoher Aktivitäten von Carboanhydrase im Mucus und deren Charakterisierung als ein besonderes Isoenzym, sollen folgende Ziele verfolgt werden: 1. Aufklärung der Primärstruktur von Mucuscarboanhydrase vom Meerschweinchen und vom Menschen, Erzeugung von Antikörpern und Identifizierung des Synthesorts im Magen-Darm-Trakt. 2. Überprüfung einer Arbeitshypothese zur Funktion dieser Carboanhydrase, wonach die Anwesenheit dieses Enzyms im Mucus die unter der Mucusschicht liegenden Epithelzellen vor den hohen im Lumen von Darm und Magen herrschenden CO₂-Partialdrücken (bis zu 0,5 atm) schützt. Hierzu werden CO₂-Mikroelektroden eingesetzt.

Mitarbeiter: T. Kleinke, V. Endeward, P. Wetzler, G. Gros. Förderung: DFG, SFB 280 (A9)

CO₂-Permeabilität biologischer Membranen

Wir haben Hinweise dafür, daß die Permeation von CO₂ durch biologische Membranen auch durch Membranproteine vermittelt wird. Umgekehrt gibt es Hinweise darauf, daß einige Membranen (in Darm, Magen, Harnblase) extrem schlecht permeabel für CO₂ sind. An Xenopus-Oocyten und Erythrocyten haben wir mit einer massenspektrometrischen Methode Evidenz erhalten, daß der Wasserkanal Aquaporin-1 einen Transportweg für CO₂ darstellt. Durch Untersuchungen der Erythrocyten von Aquaporin-1-defizienten Menschen und von Bande-3-Protein (=HCO₃⁻-Cl⁻-Antiporter)-defizienten Mäusen erhielten wir darüberhinaus Hinweise, daß neben Aquaporin-1 das Bande-3-Protein einen wichtigen Transportweg für CO₂ an Zellmembranen darstellen kann. Letzteres wurde auch bestätigt bei Untersuchungen an Erythrocyten des Schleimaals, denen das Bande-3-Protein fehlt. Die Messungen der CO₂-Permeabilität an Oocyten sollen durch die Anwendung der CO₂-Mikroelektrode ergänzt werden. Nach Abschluß der Untersuchungen an den "Modellzellen" Oocyten und Erythrocyten soll an den Epithelien von Colon und Magen untersucht werden, welche Transportwege für die hohen Permeabilitäten einiger (vor allem der basolateralen) Membranen verantwortlich sind, und welche Mechanismen für sehr schlechte Permeabilität anderer (vor allem apikaler) Membranen verantwortlich sind.

Mitarbeiter: V. Endeward, T. Peters, C. Franke, G. Gros. Kooperationen: W.F. Boron, Yale University, USA; P. Agre, Johns-Hopkins University, USA; L. Peters, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA; K. Kaila, Helsinki, Finnland. Förderung DFG, SFB 280 (A9).

Originalarbeiten:

Knüppel-Ruppert AS, Gros G, Kubis HP. Carbonic anhydrase in the heart: Immunochemical evidence for a new isozyme in human cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1335-44.

Meißner JD, Kubis HP, Scheibe RJ, Gros G. Reversible Ca^{2+} -induced fast-to-slow transition in primary skeletal muscle culture cells at the mRNA level. *J Physiol* 2000; 523.1: 19-28.

Papadopoulos S, Jürgens KD, Gros G. Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction. *Biophys J* 2000; 79: 2084-94.

Peters T, Papadopoulos F, Kubis HP, Gros G. Properties of a carbonic anhydrase inhibitor protein in flounder serum. *J Exp Biol* 2000; 203 (19): 3003-9.

Müller WH, Kleefeld D, Khattab B, Meißner JD, Scheibe RJ. Effects of retinoic acid on N-glycosylation and mRNA stability of the liver/bone/kidney alkaline phosphatase in neuronal cells. *J Cell Physiol* 2000; 182: 50-61.

Peters T, Forster RE, Gros G. Hagfish (*Myxine glutinosa*) red cell membrane exhibits no bicarbonate permeability as detected by ^{18}O exchange. *J Exp Biol* 2000; 203: 1551-60.

Scheibe RJ, Kuehl H, Krautwald S, Meißner JD, Müller WH. Ecto-alkaline phosphatase activity identified at physiological pH range on intact P19 and HL-60 cells is induced by retinoic acid. *J Cell Biochem* 2000; 76: 420-36.

Übersichtsarbeiten:

Geers C, Gros G. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol Rev* 2000; 80: 681-715.

Jürgens KD, Papadopoulos S, Peters T, Gros G. Myoglobin in skeletal muscle - Just an oxygen store or also an oxygen transporter? *NIPS News in Physiol. Sci* 2000; 15: 269 - 74

Bücher, Buchbeiträge, Lehrbücher:

Wetzel, P, Gros, G. Carbonic anhydrases in striated muscle. In: Chegwidde WR, Carter ND, Edwards YH, editors. The carbonic anhydrases, new horizons. Basel/Switzerland: Birkhäuser Verlag; 2000. p. 375-99.

Gros G. Atmung. In: v Engelhardt W, Breves G, Herausgeber. Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke Verlag; 2000. p. 217-253.

Abstracts:

(2000 wurden 9 Abstracts publiziert)

Abgeschlossene Promotionen:

Gleisberg M (Dr. med. dent): Nebenwirkungen von Carboanhydraseinhibitoren auf die Atmung in Mitochondrien von langsamen oxidativen und schnellen glykolytischen Skelettmuskeln der Ratte.

Kleinke T (Dr. rer. nat.): Extrazelluläre Carboanhydrase im Dickdarm des Meerschweinchens.

Papadopoulos F, geb. Staschen (Dr. med.): Carboanhydrase-Inhibitor im Blutserum der Flunder.

Révész-Walker B (Dr. rer. nat.): Hemmung der Carboanhydrase von isolierten Cardiomyocyten der Ratte - Einfluß auf Ca^{2+} -Transient und pH_i .